



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 342 701**

⑫ Número de solicitud: 200801292

⑮ Int. Cl.:
C12N 9/08 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
D21C 9/10 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **06.05.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
12.07.2010

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Ruiz Dueñas, Francisco Javier;**
Morales Esteban, María;
Rencoret Pazo, Jorge;
Gutiérrez Suárez, Ana;
Río Andrade, José Carlos del;
Martínez Hernández, María Jesús y
Martínez Ferrer, Ángel Tomás

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Peroxidasas mejoradas.**

㉒ Resumen:

Peroxidasas mejoradas.

La presente invención se refiere a peroxidasas fúngicas mejoradas en su capacidad para oxidar compuestos fenólicos. Dicha mejora se obtiene mediante un procedimiento basado en la identificación de aminoácidos específicos del canal principal de acceso al hemo y su modificación mediante técnicas de mutagénesis. La modificación de dichos aminoácidos en la peroxidasa versátil del hongo *Pleurotus eryngii*, consistente en la sustitución por residuos sin cadena lateral y/o con menor carga electrostática positiva, aumentó la eficiencia catalítica de dicha peroxidasa hasta nueve veces. Las peroxidasas mejoradas según la invención son de interés como biocatalizadores para aquellas aplicaciones industriales o medioambientales que requieran la modificación oxidativa de compuestos fenólicos en los sectores de la alimentación, detergentes, textil y químico, y en particular los relacionados con el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos.

ES 2 342 701 A1

DESCRIPCIÓN

Peroxidasas mejoradas.

5 Sector de la técnica

El campo de la invención es el de las peroxidasas mejoradas en su actividad catalítica. El sector de la técnica es por tanto el de las enzimas así como los procesos para obtener y mejorar las mismas, y más específicamente el de las oxidoreductasas que utilizan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u otros hidroperóxidos como aceptares finales de electrones (peroxidasas). La mejora se logra preferentemente a través de procesos de mutagénesis dirigida, mutagénesis saturante o evolución dirigida, por lo que la invención se encuadra también en el campo de la tecnología del ADN recombinante. El área de aplicación de la invención es la de la biotecnología y, más específicamente, el uso de enzimas como catalizadores en procesos industriales relacionados con la transformación de la biomasa lignocelulósica, la obtención de biocombustibles, el sector alimenticio, el desarrollo de detergentes, la producción textil y el sector químico, así como en el procesamiento de los efluentes originados en dichos procesos.

Estado de la técnica

Las peroxidasas (EC 1.11.1) tienen una amplia utilización industrial en formulación de detergentes, procesamiento de alimentos y bebidas, *kits* analíticos, biosensores, etc, así como un amplio futuro para el desarrollo de diferentes biocatalizadores industriales y medioambientales. Estas enzimas son oxidoreductasas que utilizan H_2O_2 u otros hidroperóxidos como oxidantes divalentes de la enzima, siendo la enzima activada capaz de catalizar sucesivamente dos oxidaciones monovalentes de diferentes compuestos aromáticos, colorantes, iones metálicos y otros sustratos. Dicha catálisis se lleva a cabo a través del grupo hemo, una protoporfirina IX con un átomo de hierro que actúa como cofactor de la mayoría de las peroxidasas y que está situado en una cavidad central conectada a la superficie de la enzima por uno o varios canales que permiten el acceso de los sustratos a este centro catalítico (Dunford. Heme peroxidases. Wiley-VCH, New York, 1999).

Las peroxidasas se han dividido en dos superfamilias: i) las peroxidasas animales; y ii) las peroxidasas bacterianas (Clase I, intracelulares), fúngicas (Clase II, extracelulares) y de plantas (Clase III, extracelulares) (Welinder. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 388-393. 1992). Las peroxidasas de plantas han sido las más estudiadas, especialmente la del rábano picante (*Armoracia rusticana*) conocida por sus siglas en inglés (HRP) pero son las fúngicas las que presentan mayor potencial biotecnológico. Dicho potencial se debe a que esta clase incluye las peroxidasas de los basidiomicetos ligninolíticos, caracterizadas por su elevado potencial redox. Esta característica les permite oxidar el polímero de lignina, y otros sustratos aromáticos y colorantes recalcitrantes que no pueden ser oxidados por otras peroxidasas o por las lacasas (enzimas de tipo fenoloxidasas producidas por hongos y otros organismos) (Martínez, A.T., *et al.* Biodegradation of lignocellulose: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. Intern. Microbiol. 8: 195-204. 2005).

Las peroxidasas fúngicas de alto potencial redox incluyen tres familias: lignina peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) y peroxidasas versátiles (VP, de sus siglas en inglés). Las LiP (EC 1.11.1.13) se caracterizan por su capacidad para oxidar dímeros de lignina de tipo no fenólico y otros compuestos aromáticos de alto potencial redox, siendo el alcohol veratrílico el sustrato habitualmente utilizado para medir su actividad. Las MnP (EC 1.11.1.14) oxidan específicamente el Mn^{2+} a Mn^{3+} y éste, al quelarse con ácidos orgánicos sintetizados por los hongos, actúa como un oxidante difusible durante la degradación de la lignina en la pared vegetal, aunque no es capaz de oxidar directamente sus unidades no fenólicas. Las VP (EC 1.11.1.16) descritas recientemente en especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Martínez, A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme Microb. Technol. 30: 425-444. 2002) combinan las propiedades catalíticas de la LiP y la MnP y de ciertas peroxidasas de plantas, lo que le confiere una gran versatilidad y potencial biotecnológico (Martínez, A.T. High redox potential peroxidases, En Polaina y MacCabe (Eds.) Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer, Berlin, 50 págs. 475-486, 2007).

Las peroxidasas de alto potencial redox y otras peroxidasas de basidiomicetos (que forman parte de la Clase II) presentan estructuras moleculares altamente conservadas (resueltas por difracción de rayos X) aun presentando 55 identidades en sus secuencias aminoácidas de sólo 40-50% en diferentes casos (e identidades en sus secuencias nucleotídicas lógicamente aun inferiores). Dichas semejanzas estructurales afectan tanto a la topología general de la macromolécula como al centro activo y a diferentes regiones de la enzima (incluyendo el canal principal de acceso al hemo al que se hace referencia en la presente invención) y, aunque en grados inferiores, se extienden también a las peroxidasas de plantas (Clase III) como la HRP, e incluso a las peroxidasas de origen procariota (Clase I) como la citocromo *c* peroxidasa.

La VP mejor caracterizada es la de *Pleurotus eryngii* (conocido como “seta de cardo”), un hongo modelo para los estudios de degradación selectiva de la lignina. Su caracterización ha comprendido análisis espectroscópicos y cristalográficos y la aplicación de mutagénesis dirigida, lo que ha convertido a la VP en un modelo tanto para el estudio de 65 mecanismos generales de la catálisis por peroxidasas como para el establecimiento de las bases estructurales de sus propiedades catalíticas únicas (Ruiz-Dueñas, F. J. *et al.* Structure-function studies of *Pleurotus* versatile peroxidase, A model ligninolytic enzyme. Proc. OxiZymes en Oeiras, 7-9 September, Oeiras, Portugal. 2006). Estos estudios han permitido demostrar por primera vez la existencia de un radical de proteína en una peroxidasa fúngica (Pogni, R.

et al. A tryptophan neutral radical in the oxidized state of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii*: a combined multi-frequency EPR and DFT study. J. Biol. Chem. 281: 9517-9526. 2006) y establecer las bases estructurales de su actividad sobre sustratos de alto potencial redox y de la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} (Pérez-Boada, M. *et al.* Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. J. Mol. Biol. 354: 385-402. 2005; Ruiz-Dueñas, F.J. *et al.* Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: A site-directed mutagenesis, kinetic and crystallographic study. Biochemistry 46: 66-77. 2007).

Las reacciones sobre los sustratos aromáticos de alto potencial redox y sobre el Mn^{2+} tienen lugar en dos sitios catalíticos distintos de la VP. Los estudios recientes de los autores de la presente invención indican la existencia de un tercer sitio catalítico implicado en la oxidación de fenoles, situado en el canal principal de acceso al grupo hemo. La presente invención consiste tanto en un procedimiento para aumentar la eficiencia catalítica de peroxidasas de clase II oxidando fenoles, basado en la mutación de los aminoácidos que forman el canal principal de acceso de los sustratos hasta el grupo hemo, como en las variantes de VP con mayor eficiencia catalítica sobre diversos sustratos fenólicos obtenidas por aplicación de dicho procedimiento y las secuencias de ADN que codifican estas proteínas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la identificación por los inventores de varios sitios catalíticos diferentes en la VP de *P. eryngii*, incluyendo un sitio para la oxidación del Mn^{2+} junto al propionato interno del hemo, otro para la oxidación de sustratos de alto potencial redox en un triptófano superficial y un tercero para la oxidación de sustratos fenólicos. Este tercer sitio catalítico está situado en el canal principal de acceso al grupo hemo de dicha enzima y los inventores han demostrado que ciertas mutaciones en dicho canal, que amplían su apertura y reducen su carga electrostática positiva, inducen un incremento de la eficiencia catalítica de la VP oxidando diferentes fenoles.

La presente invención comprende por tanto variantes de enzimas del grupo de las peroxidasas fúngicas que presentan una mejora en su eficiencia catalítica para la oxidación de sustratos fenólicos. Asimismo, la invención incluye el procedimiento para producir dichas enzimas mejoradas que supone la modificación de al menos uno de los aminoácidos que forman el canal principal de acceso al grupo hemo, donde se localiza el sitio de oxidación de sustratos fenólicos por esta enzima. Las modificaciones se basan en la información disponible sobre las relaciones estructura-función en la VP (EC 1.11.1.16) del hongo *Pleurotus eryngii*, aplicables tanto a dicha peroxidasa como a otras peroxidasas de hongos que presentan homología estructural con la misma (en las que los aminoácidos que forman el canal principal de acceso al grupo hemo son identificables a partir de una estructura cristalográfica, tras modelado molecular por homología con la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii* o peroxidasas relacionadas, o por simple alineamiento de secuencias aminoacídicas).

El procedimiento de mejora comprende la modificación de al menos uno de los aminoácidos que forman el canal principal de acceso al grupo hemo, consistiendo dicha modificación en la sustitución de dicho aminoácido por otro que presente una cadena lateral de menor tamaño o con una carga electrostática diferente. Dicha modificación puede ser parte de un procedimiento que comprende las siguientes fases:

1) Identificación de los aminoácidos que conforman el canal principal de acceso al grupo hemo a partir de la estructura tridimensional de la enzima, resuelta por estudios cristalográficos, tras modelado por homología o por simple alineamiento de las secuencias aminoacídicas.

2) Diseño de mutaciones en al menos uno de dichos aminoácidos para ampliar la apertura del canal o para modificar su carga electrostática o para lograr una combinación de ambos efectos. De manera preferente las mutaciones consisten en: a) sustituciones de dichos aminoácidos por otros con cadenas laterales de menor tamaño o sin cadenas laterales, para aumentar la apertura del canal, b) sustituciones de aminoácidos para modificar, reducir o eliminar su carga electrostática, o c) una combinación de a) y b).

3) Modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima para que incluya al menos un cambio en la secuencia de aminoácidos según el diseño obtenido en la fase anterior. De manera preferente la modificación de la secuencia de nucleótidos se realiza mediante técnicas de mutagénesis dirigida, aunque también se puede realizar mediante mutagénesis saturante, utilizando métodos de evolución dirigida o recurriendo al uso de genes sintéticos. La secuencia de nucleótidos modificada es posteriormente expresada de manera preferente en un sistema que permita la correcta formación de los puentes disulfuro e incorporación del grupo hemo y de los dos iones Ca^{2+} estructurales *in vivo* (dando lugar a una peroxidasa activa) aunque también se pueden emplear métodos de replegado en los que la formación de los puentes disulfuro e incorporación del grupo hemo y de los dos iones Ca^{2+} estructurales se lleve a cabo posteriormente a la expresión (activación *in vitro*).

4) Selección de las variantes según el grado de aumento en la eficiencia catalítica u otros parámetros de interés industrial.

En una realización de la presente invención el procedimiento se aplica a la mejora de la VP de *Pleurotus eryngii* escogida como modelo de peroxidasa fúngica. La fase 1 del procedimiento se lleva a cabo sobre la variante alélica VPL2, cuya secuencia se encuentra depositada en la base de datos de secuencias de ADN GenBank (Benson, D.A.

et al. GenBank. Nucleic Acids Res. 35: D21-D25. 2007, accesible a través del sitio web www.ncbi.nlm.nih.gov) con la referencia AF007222. Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de la proteína madura corresponden a la SEQ ID NO1 y SEQ ID NO2, respectivamente. La estructura cristalográfica de la VPL2 está depositada en la base de datos estructurales de proteínas PDB (Berman, H.M. *et al.*, The Protein DataBank. Nucleic Acids Res. 28: 235-242. 2000) con la referencia 2BOQ (Pérez-Boada, M. *et al.* Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. J. Mol. Biol. 354: 385-402. 2005). El análisis de esta estructura cristalográfica muestra que el canal principal de acceso al grupo hemo en la VP está formado por los siguientes aminoácidos (Figura 1 y SEQ ID NO2, residuos indicados en negrita): Ala77, Ala79, Glu140, Phe142, Gly80, Lys176, Lys215, Asn214, Pro141, Pro76 y Val177 (donde Ala indica Alanina, Glu indica Ácido Glutámico, Phe indica Fenilalanina, Gly indica Glicina, Lys indica Lisina, Asn indica Asparagina, Pro indica Prolina y Val indica Valina, y cada uno de los números indica la posición en la secuencia de aminoácidos de la proteína madura, tras eliminación del péptido señal). Las coordenadas atómicas de estos residuos, junto con las del grupo hemo, se proporcionan en la Tabla 1.

En esta realización particular de la invención, el diseño de mutaciones en el canal de acceso al hemo con objeto de ampliar su apertura y reducir la carga electrostática positiva en el mismo (fase 2 del procedimiento de la invención) da lugar a distintas variantes que incluyen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención mutaciones simples, dobles o triples, que afectan respectivamente a uno, dos o tres aminoácidos de los que forman parte de dicho canal.

En una realización particular, la invención comprende, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica una VP, tal como la SEQ ID NO1 o un fragmento de la misma o una secuencia homóloga a la SEQ ID NO1 o a un fragmento de la misma, modificada para que codifique una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una mutación seleccionada dentro del grupo formado por: Pro76Gly, Glu140Gly, Pro141Gly, Phe142Gly, Lys176Asp, Lys176Gly, Lys215Gln, Lys215Gly (mutaciones simples), Glu140Gly:Pro141Gly, Glu140Gly:Lys176Gly (mutaciones dobles), y Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly (mutación triple) (Tablas 2 y 3). En el sentido utilizado en esta descripción, una secuencia de nucleótidos es homóloga a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO1 o a un fragmento de la misma cuando ambas tienen un grado de identidad de al menos un 30% de la secuencia, preferentemente de más del 40% de la secuencia y, en realizaciones sucesivamente más preferidas, un grado de identidad de al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97 y 99%.

En otra realización particular, la invención comprende, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la misma, una secuencia de aminoácidos de una VP, tal como la SEQ ID NO2 o un fragmento de la misma o secuencias homólogas a la SEQ ID NO2 o a un fragmento de la misma, modificada para que la secuencia de aminoácidos resultante incluya al menos una mutación seleccionada dentro del grupo formado por: Pro76Gly, Glu140Gly, Pro141Gly, Phe142Gly, Lys176Asp, Lys176Gly, Lys215Gln, Lys215Gly, Glu140Gly:Pro141Gly, Glu140Gly:Lys176Gly, y Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly (Tablas 2 y 3). En el sentido utilizado en esta descripción, una secuencia de aminoácidos es homóloga a la SEQ ID NO2 o a un fragmento de la misma cuando ambas tienen un grado de identidad de al menos un 40% de la secuencia, preferentemente de más del 50% de la secuencia, y, en realizaciones sucesivamente más preferidas, un grado de identidad de al menos el 60, 70, 80, 90, 95, 97 y 99%.

En adelante, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos resultantes de las modificaciones descritas se denominarán secuencias de nucleótidos de la invención y secuencias de aminoácidos de la invención, respectivamente. Igualmente, la peroxidasa caracterizada por comprender al menos una de las secuencias de aminoácidos de la invención se denominará “peroxidasa de la invención”.

Para la interpretación de las mutaciones señaladas anteriormente, el número indica la posición en la secuencia de aminoácidos de la VP madura (SEQ ID NO2) del residuo que se quiere mutar, el primer aminoácido es el original en la secuencia SEQ ID NO2 y el segundo es aquel por el que se muta. Asp indica Ácido Aspártico, Gln indica Glutamina, Glu indica Ácido Glutámico, Gly indica Glicina, Lys indica Lisina, Phe indica Fenilalanina y Pro indica Prolina.

En una realización particular de la invención, la incorporación de estas mutaciones a la VP se lleva a cabo mediante el proceso de “mutagénesis dirigida”, consistente en la introducción de cambios puntuales en la secuencia de ADN que codifica dicha enzima. Estos cambios se introducen en el ADN complementario (ADNc) del ARN mensajero (ARNm) que codifica la VP (y carece de las secuencias no codificantes, “intrones”, presentes en el ADN genómico eucariota), clonado en un vector de expresión. El vector resultante se usa como molde en reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR) en las que se emplea una polimerasa de alta fidelidad con objeto de que los cambios en el ADN se limiten a los deseados. Para cada mutación se diseñan al menos dos oligonucleótidos “cebadores” de la reacción de PCR, cuyas secuencias incorporan el cambio deseado en el codón adecuado y son complementarias a hebras opuestas de la misma región de ADN (Tabla 2). La comprobación de que las cadenas de ADN resultantes de la PCR portan únicamente las mutaciones deseadas puede lograrse mediante su secuenciación.

La modificación de la secuencia de aminoácidos de las diferentes peroxidasas también puede llevarse a cabo mediante el procedimiento denominado “evolución dirigida” (o “evolución forzada”), que comprende las siguientes fases:

1) Introducción de mutaciones al azar en la secuencia que codifica la peroxidasa a ser mejorada, preferentemente en la región que codifica los residuos del canal principal de acceso al hemo y zonas colindantes. La mutagénesis al

azar puede realizarse *in vitro* mediante PCR de dicho ADNc en condiciones mutagénicas (por ejemplo mediante uso de ADN polimerasas proclives al error). El proceso de mutagénesis también se puede realizar *in vivo* (por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae*) utilizando la técnica denominada “DNA shuffling” o “mezclado de ADN”, que permite combinar en una sola secuencia de ADNc varias de las mutaciones generadas *in vitro*.

2) Expresión heteróloga de la enzima en forma activa a partir de las secuencias mutadas, por ejemplo utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* desarrolladas para este fin.

3) Selección mediante un sistema de alta eficiencia (“high-throughput”) de aquellos cambios que modifiquen la actividad catalítica de la peroxidasa en el sentido deseado.

4) Repetición de varios ciclos de mutagénesis y/o mezclado de ADN-expresión-selección (fases 1-3) hasta obtener la peroxidasa mejorada en el sentido deseado.

Igualmente puede utilizarse la mutagénesis saturante combinatoria basada en la introducción de todas las combinaciones posibles de mutaciones en una región de la proteína (en este caso el canal de acceso al hemo). Ésta se lleva a cabo mediante PCR del ADNc utilizando una mezcla de oligonucleótidos cebadores que incluyan los cambios necesarios en su secuencia para dar lugar a todas las variantes mutadas posibles (incluyendo los 20 aminoácidos proteicos) en una o varias posiciones de la secuencia polipeptídica, en el caso de la mutagénesis saturante.

La mutagénesis dirigida o saturante y la evolución dirigida pueden también combinarse para obtener mejoras adicionales en las propiedades catalíticas de las variantes obtenidas con cada una de las técnicas.

En aquellos casos en los que se haya realizado mutagénesis *in vivo* la secuencia de nucleótidos modificada se encontrará ya en un sistema de expresión (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), pero cuando la mutagénesis se realiza *in vitro*, dicha secuencia requiere la transformación de un sistema de expresión, para lograr la enzima recombinante. En una realización particular de la invención, la secuencia de ADN modificada se incorpora en un plásmido, que actúa como vector de expresión para transformar *Escherichia coli*. En distintas realizaciones de la invención el sistema de expresión puede ser procariota (*Escherichia coli*, especies del género *Bacillus*, u otros) o eucariota (como especies fúngicas de los géneros *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pycnoporus*, *Pichia*, *Saccharomyces* u otros). Cuando la proteína se exprese en sistemas procariotas, deberá posteriormente ser activada *in vitro* para la correcta formación de los puentes disulfuro e incorporación del grupo hemo y de los dos iones Ca^{2+} estructurales (Pérez-Boada, M. *et al.* Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. Enzyme Microb. Technol. 30: 518-524. 2002).

Las distintas variantes de la peroxidasa recombinante deben ensayarse con los sustratos susceptibles de ser oxidados por la misma, para seleccionar aquellos cambios que modifiquen su actividad catalítica en el sentido deseado y, en su caso, diseñar otros cambios distintos o complementarios. En una realización de la invención, las variantes de la VP se ensayan respecto a su capacidad para oxidar en condiciones de estado estacionario (con exceso de sustratos oxidante y reductor) los siguientes sustratos: a) fenoles sustituidos, tales como el guayacol (2-metoxifenol) y el siringol (2,6-dimetoxifenol); b) hidroquinonas, tales como el catecol (*orto*-hidroquinona) y la *para*-hidroquinona; y c) otros sustratos de interés, tal como el siringato de metilo (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato de metilo) que es utilizado como mediador en reacciones catalizadas por oxidorreductasas de bajo potencial redox. Esta realización puede llevarse a cabo igualmente ensayando las variantes sobre otros sustratos susceptibles de ser oxidados por la VP.

La evaluación de las distintas variantes puede lograrse determinando distintos parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la peroxidasa. En una realización particular de la presente invención la evaluación de las variantes de la VP descritas anteriormente se lleva a cabo midiendo la eficiencia catalítica en la oxidación de diversos sustratos fenólicos (Tabla 3). La eficiencia catalítica es la relación entre la k_{cat} (constante catalítica de una reacción enzimática, o número de recambio, que indica la velocidad con la que un sustrato se convierte en producto) y la K_m (constante de Michaelis, que indica la afinidad de la enzima por un sustrato dado) y nos revela la capacidad de una enzima para catalizar la modificación de un sustrato dado.

En dicha realización particular, la eliminación de la cadena lateral de Glu140 (Glu140Gly) y la supresión simultánea de las cadenas laterales de Glu140 y Lys176 (Glu140Gly:Lys176Gly) son las mutaciones simple y doble, respectivamente, que provocan el mayor aumento en la eficiencia catalítica de la VP para oxidar sustratos fenólicos, incluyendo fenoles sustituidos e hidroquinonas (Tabla 3), así como el siringato de metilo. Una mutación adicional (en la variante triple Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly) mejora la eficiencia de oxidación de la *para*-hidroquinona respecto a las dos mutaciones anteriores. Asimismo, la mutación simple dirigida a la reducción de la carga positiva en el canal de acceso al hemo que permite obtener variantes mejoradas en su eficiencia catalítica es Lys176Asp.

La falta de efecto de las mutaciones sobre la eficiencia catalítica respecto a los sustratos de la VP que son oxidados en otros sitios catalíticos (tales como el alcohol veratrílico y el colorante *Reactive Black 5*, que son oxidados por transferencia electrónica en un residuo superficial, el triptófano 164) o que acceden al grupo hemo por otro canal distinto (el Mn^{2+}) confirma que la mejora de las variantes de VP de la presente invención se logra por modificación del canal principal de acceso al grupo hemo.

Los inventores han demostrado asimismo que las variantes de VP mejoradas pueden aplicarse en el tratamiento de mezclas complejas de compuestos fenólicos presentes en efluentes industriales con un resultado mucho más eficiente que el logrado por la enzima nativa, habiendo observado porcentajes de eliminación de los fenoles presentes en dicha mezcla de hasta un 85% en 5 minutos, lo que supone una mejora de 7 veces respecto a lo observado en el caso de la enzima nativa (Figura 2). Así, otro aspecto de la presente invención es la aplicación de una o más variantes de VP de la invención a procesos industriales que requieran la oxidación de compuestos fenólicos.

Entre otros, y a modo de ejemplos no limitativos del alcance de la invención, pueden citarse la transformación industrial de la biomasa lignocelulósica, el tratamiento de efluentes, la modificación de ligninas, la polimerización de fenoles, la obtención de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos, la funcionalización de fibras de celulosa, la coloración de fibras textiles, la síntesis química basada en fenoles, el procesamiento de alimentos y bebidas, la producción de detergentes enzimáticos, la obtención de *kits* analíticos y la fabricación de biosensores.

Asimismo los inventores han encontrado que las variantes de VP que presentan las mutaciones Glu140Gly y Glu140Gly:Lys176Gly también mejoran significativamente la capacidad de la peroxidasa para oxidar el siringato de metilo (aumentando, respectivamente, tres y siete veces el valor de la *k_{cat}*, y, en ambas variantes, dos veces el valor de la eficiencia catalítica) un compuesto utilizado como mediador en reacciones catalizadas por peroxidasas de bajo potencial redox. Así, otro aspecto de la invención consiste en la aplicación de una o más variantes de la VP en reacciones en las que participan ciertos compuestos fenólicos (por ejemplo, el siringato de metilo y compuestos relacionados), como mediadores redox aumentando la capacidad oxidativa de las peroxidasas (sistemas peroxidasa-mediador). Este aspecto puede ser de interés en varios de los sectores y aplicaciones industriales mencionadas anteriormente en los que se aplican estos sistemas.

Otro aspecto de la presente invención es la aplicación del procedimiento de mejora descrito anteriormente para lograr variantes de otras peroxidasas fúngicas, distintas a la VP de *Pleurotus eryngii*, en las que se mejore su capacidad para oxidar fenoles. La identificación de los residuos a modificar en el canal de acceso al hemo de las diferentes peroxidasas fúngicas se realiza mediante alineamiento de sus secuencias de aminoácidos y, preferentemente, mediante superposición de sus estructuras moleculares con la estructura molecular de la VP de *Pleurotus eryngii* descrita anteriormente. Las estructuras moleculares de la distintas peroxidadas a mejorar pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de estudios de difracción de rayos X o como modelos teóricos utilizando las facilidades de SwissModel accesibles en la página web <http://swissmodel.expasy.org> (Schwede, T. *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31, 3381-3385. 2003) o programas semejantes. De esta forma es posible identificar qué aminoácidos participan en la formación del canal de acceso al hemo en cada peroxidasa y deducir su implicación en la oxidación de fenoles por comparación con los aminoácidos correspondientes de la VP de *Pleurotus eryngii*. Así, por ejemplo se deduce que en la LiP-H8 (una isoenzima de la LiP del hongo *Phanerochaete chrysosporium*) los residuos homólogos a Glu140 y Lys176 de la isoenzima VPL2 de *Pleurotus eryngii* son Glu146 y Asp183, respectivamente. Este aspecto de la invención es más directamente aplicable conforme mayor es el grado de parentesco filogenético de la peroxidasa a modificar con la VP de *Pleurotus eryngii*. A medida que dicho parentesco sea más lejano el procedimiento de mejora seguirá siendo aplicable pero, dado que la predicción de los residuos a modificar será menos precisa, resultará necesario repetir más veces el proceso de mutagénesis.

La presente invención es aplicable a peroxidasas con diferentes grados de parentesco filogenético y funcional con la VP de *Pleurotus eryngii*, comprendidas en el grupo formado por:

- a) VP (EC 1.11.1.16) de otras especies fúngicas, incluyendo pero sin limitarse a las mismas, las VP producidas por *Pleurotus eryngii*, como por ejemplo las producidas por la cepa CBS 613.91 (del Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS, Utrecht, Países Bajos), las VP de otras especies del género *Pleurotus*, como por ejemplo *Pleurotus pulmonarius* (incluyendo la cepa CBS 507.85), *Pleurotus ostreatus* (incluyendo las cepas secuenciadas en el JGI del Departamento de Energía de Estados Unidos, proyecto CSP #776985; y la cepa CBS 411.71); así como las VP de especies del género *Bjerkandera*, como por ejemplo *Bjerkandera adusta* (incluyendo la cepa CBS 230.93) y otras especies (incluyendo la cepa BOS55 utilizada en los estudios de J.A. Field en la Universidad de Wageningen, Países Bajos).
- b) LiP (EC 1.11.1.13) y MnP (EC 1.11.1.14) de hongos basidiomicetos ligninolíticos, incluyendo pero sin limitarse a las mismas, la LiP, MnP y peroxidasas relacionadas de *Phanerochaete chrysosporium* (por ejemplo las de la cepa RP-78 secuenciada en el JGI) y las de especies ligninolíticas de los géneros *Trametes*, *Phlebia*, *Bjerkandera*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Ganoderma*, *Agaricus* y *Dichomitus*, entre otros.
- c) otras enzimas de basidiomicetos ligninolíticos (y sus denominadas formas anamórficas o asexuales) clasificadas como simples peroxidasas (EC 1.11.1.7), con una denominación no recogida en la clasificación de enzimas, o sin denominación; y
- d) peroxidasas de basidiomicetos no ligninolíticos y de ascomicetos (incluyendo sus denominadas formas anamórficas o asexuales).

Así pues, la presente invención puede utilizarse específicamente para mejorar las actividades catalíticas de las peroxidasas de hongos cuyas secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos se conocen ya, así como las conocidas en

el futuro. Como ejemplos no limitativos podemos citar: VPL1, VPL2, VPL3 y VPS1 de *Pleurotus eryngii* (referencias en las bases de datos de secuencias: AAD01401, AAD01404, CAD56164/AAZ04666 y AAD54310, respectivamente); VP de *Bjerkandera* sp (AA047909), VP de *Pleurotus sapidus* (CAJ01576), LiP de *Bjerkandera adusta* (1906181A); LiP-F, LiP-H2, cuatro secuencias de LiP-H8, LiP-H10 y LiP-J de *Phanerochaete chrysosporium* (AAA33736, CAA33621, AAA33738, AAA33741, AAA53109, AAA56852, AAA33739 y AAD46494, respectivamente), LiP-7, LiP-12 y LiP-GII de *Trametes versicolor* (CAA83140, AAA34049 y CAA53333, respectivamente), LiP de *Trametes cervina* (BAD52441), LiP de *Phlebia radiata* (P20010), MnP1, MnP2 y MnP3 de *Phanerochaete chrysosporium* (AAA33744, AAA33745 y AAB39652, respectivamente), MnP1, MnP2, MnP3 y MnP4 de *Ceriporiopsis subvermispora* (AAB03480, AAD43581, AAD45725 y AA061784, respectivamente), MnP1 y MnP2 de *Dichomitus squalens* (AAF31329 y AAF31330, respectivamente), MnP de *Ganoderma formosanum* (ABB77243), MnP de *Ganoderma australe* (ABB77244), MnP1, MnP2 y MnP3 de *Pleurotus ostreatus* (AAA84396, CAB51617 y BAA33449, respectivamente), MnP1 de *Ganoderma applanatum* (BAA88392), MnP1, MnP2 y MnP3 de *Phanerochaete sordida* (BAC06185, BAC06186 y BAC06187, respectivamente), MnP2 de *Trametes versicolor* (CAA83148), MnP2 y MnP3 de *Phlebia radiata* (CAC85963 y CAC84573, respectivamente), MnP de *Agaricus bisporus* (CAG27835), peroxidasa reprimida por manganeso de *Trametes versicolor* (AAB63460), peroxidasa NOPA de *Phanerochaete chrysosporium* (AAU82081), peroxidasa de *Coprinopsis cinerea* (CAA50060), y peroxidases PGV y PGVII de *Trametes versicolor* (CAA54398 y CAA91043, respectivamente). La presente invención podrá también mejorar cualquier peroxidasa relacionada con las anteriores que se descubra en el futuro.

De manera similar a la descrita anteriormente para la VPL2 de *Pleurotus eryngii*, el procedimiento general para la mejora de peroxidases fúngicas comprende la modificación de al menos uno de los aminoácidos que forman el canal principal de acceso al grupo hemo, donde se produce la oxidación de los sustratos fenólicos. En una realización particular de este procedimiento general para la mejora de peroxidases fúngicas, el mismo consta de las siguientes fases:

1) Identificación de los aminoácidos que conforman el canal principal de acceso al grupo hemo mediante alineamiento de sus secuencias de aminoácidos y, preferentemente, mediante superposición de sus estructuras moleculares con la estructura molecular de la VP de *Pleurotus eryngii* descrita anteriormente. Las estructuras moleculares de las distintas peroxidases a mejorar pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de estudios de difracción de rayos X o mediante modelado molecular por homología.

2) Diseño de las mutaciones en al menos uno de dichos aminoácidos para ampliar la apertura de dicho canal o para modificar o reducir su carga electrostática o para lograr una combinación de ambos objetivos. De manera preferente las mutaciones consisten en: a) sustituciones de aminoácidos con cadenas laterales por aminoácidos con cadenas laterales de menor tamaño o sin cadenas laterales, para aumentar la apertura del canal, b) sustituciones de aminoácidos para modificar, reducir o eliminar su carga electrostática, o c) una combinación de a) y b).

3) Modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima para que comprenda al menos una de las mutaciones correspondientes a las modificaciones en la secuencia de aminoácidos según el diseño obtenido en la fase anterior. De manera preferente la modificación de la secuencia de nucleótidos se realiza mediante técnicas de mutagénesis dirigida, en las que los métodos para lograr las mutaciones están dirigidos a obtener únicamente las deseadas. Sin embargo esta modificación puede también llevarse a cabo mediante los procedimientos denominados mutagénesis saturante y evolución dirigida, así como recurriendo al uso de genes sintéticos. El primero se basa en la introducción de mutaciones en la región de interés que suponen la sustitución de uno o varios aminoácidos por los diecinueve aminoácidos restantes (en la presente invención, la región que codifica los residuos del canal principal de acceso al grupo hemo y zonas colindantes); la segunda se basa en la introducción de mutaciones al azar en la secuencia completa de nucleótidos que codifica la proteína a modificar y la tercera en la síntesis *in vitro* de genes con la secuencia nucleotídica deseada. En todos los casos se continúa con la expresión de la secuencia de nucleótidos mutada en un sistema de expresión. En los casos de la evolución dirigida y la mutagénesis saturante combinatoria, se requiere la selección mediante un sistema de alta eficiencia (*high-throughput*) de las proteínas mutadas que presenten modificaciones en el sentido deseado. En el caso de la evolución dirigida, se concluye con la repetición de varios ciclos de mutagenesis-expresión-selección hasta obtener la mejora deseada. La introducción de mutaciones al azar puede realizarse *in vitro* (por ejemplo mediante PCR en condiciones mutagénicas), y la combinación de las mutaciones más interesantes previamente obtenidas puede realizarse *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo utilizando la técnica denominada *DNA shuffling* o mezclado de ADN) para obtener las mejoras deseadas y otras adicionales. La expresión de la secuencia de nucleótidos modificada se realiza en un sistema que permita la correcta formación de los puentes disulfuro e incorporación del grupo hemo, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Para la presente invención se consideran en particular *Escherichia coli*, *Bacillus*, y especies fúngicas de los géneros *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pycnoporus*, *Pichia*, y *Saccharomyces*. Tras la expresión en *Escherichia coli* el método de preferencia para lograr la correcta formación de los puentes disulfuro e incorporación del grupo hemo y de los dos iones Ca^{2+} estructurales *in vitro* está descrito en Pérez-Boada, M. *et al.* (Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. Enzyme Microb. Technol. 30: 518-524. 2002).

4) Selección de las variantes según el grado de aumento en la eficiencia catalítica u otros parámetros de interés industrial.

El resultado final será la obtención de variantes de peroxidasas fúngicas mejoradas en su acción sobre diferentes compuestos fenólicos, tal como se ha mostrado anteriormente para la VP de *Pleurotus eryngii*. La actividad mejorada de estas peroxidasas supone una ventaja para su aplicación en diferentes procesos industriales entre los que pueden citarse, aunque no exclusivamente, la transformación industrial de la biomasa lignocelulósica, el tratamiento de efluentes, la modificación de ligninas, la polimerización de fenoles, la obtención de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos, la funcionalización de fibras de celulosa, la coloración de fibras textiles, la síntesis química basada en fenoles, el procesamiento de alimentos y bebidas, la producción de detergentes enzimáticos, la obtención de kits analíticos y la fabricación de biosensores. También puede ser de interés para la mejora de los sistemas peroxidasas-mediador, de utilidad en varios de dichos sectores y aplicaciones. Un aspecto de la invención es por tanto el uso de una peroxidasa de la invención para catalizar oxidaciones monovalentes de diferentes compuestos, y preferentemente de compuestos fenólicos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos de la invención y además, preferentemente, comprende al menos una secuencia promotora que permita la expresión de dicha secuencia. En adelante esta construcción será denominada “construcción génica de la invención”.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la invención o una construcción génica de la invención. En adelante este vector será denominado “vector de la invención”. El tipo de vector adecuado para la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención y de las diferentes construcciones génicas dependerá del organismo en el que se desee obtener la secuencia de aminoácidos de la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con una célula u organismo hospedador que contiene al menos una construcción génica de la invención o un vector de la invención. En adelante esta célula u organismo será denominado “célula transformada de la invención” u “organismo transformado de la invención”, respectivamente. El tipo de célula u organismo hospedador adecuado dependerá de la facilidad para su transformación con la secuencia de nucleótidos de la invención, del nivel de expresión de la secuencia de aminoácidos de la invención logrado, de la correcta formación de la estructura terciaria de la correspondiente peroxidasa de la invención, incluyendo la incorporación del grupo hemo y los dos iones calcio estructurales y la formación de los puentes disulfuro, del procedimiento necesario para aislarla, así como de los distintos aspectos que permitan la obtención de una peroxidasa de la invención que presente las mejoras en su acción catalítica. En la presente invención se han relacionado anteriormente distintos ejemplos de organismos hospedadores a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la misma.

En un último aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener la peroxidasa de la invención que comprende transformar una célula u organismo con un vector de la invención o secuencia de nucleótidos de la invención y recuperar el polipéptido correspondiente, sometiéndolo en su caso a modificaciones posteriores *in vitro* para lograr una peroxidasa de la invención completamente funcional.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de los residuos de aminoácidos que forman el canal principal de acceso al grupo hemo (que puede observarse al fondo) en la VP de *Pleurotus eryngii*, según el análisis de la estructura cristalográfica de la variante alélica VPL2. Los átomos de los aminoácidos se representan como esferas de van der Waals y el grupo hemo como una estructura de barras.

Figura 2. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas de un extracto fenólico (concentración de 0.2 mg/mL) proveniente de un efluente de una industria papelera sin tratamiento (A); tratado 5 minutos a 25°C con VP (1 µM) no modificada (B); y tratado en las mismas condiciones con una variante de esta peroxidasa (VP-Glu140Gly:Lys176Gly) mejorada según la presente invención (C). Se señala la posición de los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos fenólicos mayoritarios en dicho extracto: siringaldehído, acetosiringona, vainillina y acetoguaconona.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los tres siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Modificación del canal de acceso al hemo de la peroxidasa versátil

La estructura molecular de la VP de *Pleurotus eryngii*, y más específicamente de la variante alélica VPL2, fue resuelta por difracción de rayos X y se encuentra depositada en la base de datos de estructuras de proteínas PDB (referencia 2BOQ). Las coordenadas atómicas obtenidas para los residuos aminoacídicos que aparecen delimitando

el canal principal de acceso al hemo en esta estructura molecular, así como las del mismo grupo hemo, se indican en la Tabla 1. Las tres primeras columnas de dicha tabla indican el número y tipo de átomo (utilizando la nomenclatura habitual para los aminoácidos), las tres siguientes el tipo y número de aminoácido o cofactor (todos ellos de la cadena A), las tres siguientes las coordenadas cartesianas de cada átomo, las dos siguientes el factor de ocupación y el factor térmico, y la última columna el tipo de átomo (N, C, O o Fe). Utilizando esta información es posible obtener una representación tridimensional del canal de acceso al hemo en la VP.

Esta representación tridimensional (Figura 1) muestra la posición de las cadenas laterales de los residuos anteriores que delimitan el canal de acceso al hemo, incluyendo varias cadenas voluminosas, como las de Pro76, Pro141 y Phe142, dos cadenas laterales de tipo básico, de Lys176 y Lys215, y una de tipo ácido, de Glu140.

Esta información se usó para establecer cuales de estos aminoácidos debían ser modificados para aumentar el tamaño de dicho canal o para modificar la distribución de carga electrostática, con objeto de mejorar las propiedades catalíticas de la enzima sobre los sustratos fenólicos cuya oxidación tiene lugar en dicha región de la proteína.

Para aumentar el tamaño del canal, se eliminaron las cadenas laterales de los seis residuos mencionados sustituyéndolos por residuos de glicina (que carecen de cadena lateral) en las correspondientes mutaciones sencillas y en tres mutaciones múltiples (Glu140:Pro141Gly, Glu140Gly:Lys176:Gly y Glu140:Gly:Pro141Gly: Lys176Gly). Tres de las mutaciones sencillas, dan también lugar a un cambio de carga neta en la región al sustituir dos residuos básicos (Lys176 o Lys215) o uno ácido (Glu140) por un residuo no cargado (glicina). Las tres mutaciones múltiples también incluyeron residuos cargados aunque, en el caso de las dos últimas, la carga neta en la correspondiente región de la proteína no resultó alterada al eliminarse tanto un residuo ácido (Glu140) como uno básico (Lys176). También se investigó el efecto de sustituir un residuo básico (Lys215) por otro residuo voluminoso pero no cargado, mediante la mutación Lys215Gln. Finalmente, el mayor cambio de carga electrostática en la zona se obtuvo al sustituir un residuo básico (Lys176) por otro con carga de signo contrario, mediante la mutación Lys176Asp.

El ADNc que codifica la VP madura de *Pleurotus eryngii* (variante alélica VPL2 depositada en GenBank con la referencia AF007222) se clonó en el vector de expresión pFLAG1 (International Biotechnologies Inc.). El plásmido resultante se usó como molde en reacciones de PCR en las que se empleó una ADN polimerasa de alta fidelidad (PfuTurbo de Stratagene) con objeto de evitar cambios no deseados durante el proceso de amplificación del ADN.

Para introducir cada mutación se diseñaron los oligonucleótidos cebadores de la reacción de PCR que incorporan el cambio deseado y son complementarios a regiones discretas alrededor del mismo. Los codones que se cambian para generar las diferentes mutaciones simples en el canal de acceso al hemo fueron: CCC por GGC (mutación Pro76Gly), GAG por GGA (mutación Glu140Gly), CCT por GGT (mutación Pro141Gly), TTT por GGT (mutación Phe142Gly), AAG por GGA (mutación Lys176Gly), AAG por GAC (mutación Lys176Asp), AAG por GGC (mutación Lys215Gly) y AAG por CAG (mutación Lys215Gln). La mutación doble Glu 140Gly:Pro141 Gly se obtuvo incluyendo los codones para ambos aminoácidos en el mismo cebador (sustitución de GAGCCT por GGCGGT), y la mutación Glu140Gly:Lys176Gly se generó cambiando el triplete AAG por GGA (Lys176Gly) en el plásmido pFLAG1-VPL2 (Glu140Gly), que se empleó como molde en la reacción de PCR. La mutación triple Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly se obtuvo como se describe para la mutación Pro141Gly usando el plásmido pFLAG1-VPL2(Glu140Gly:Lys176Gly) como molde. Un resumen de las mutaciones introducidas en la VP, los oligonucleótidos cebadores directos y complementarios utilizados en cada caso (con el triplete correspondiente al aminoácido modificado subrayado y el nucleótido/s mutado/s en negrita) así como el ADN utilizado como molde en las correspondientes reacciones de PCR, se indica en la Tabla 2.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l utilizando 10 ng de ADN molde (ADN plasmídico con el ADNc de la VP), una concentración 500 μ M de cada uno de los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), 125 ng de los oligonucleótidos cebadores, y 2.5 unidades de PfuTurbo (Stratagene). Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 18 ciclos de 50 segundos a 95°C, 50 segundos a 55°C y 10 minutos a 68°C, y un ciclo final de 10 minutos a 68°C. Los ADNc mutados se secuenciaron completamente para comprobar que portaban únicamente las mutaciones deseadas. Para llevar a cabo la propagación de los plásmidos que incorporan los ADNc mutados se utilizó la cepa DH5 de *Escherichia coli*, mientras que para la expresión de la enzima nativa y de las diferentes variantes mutadas se usó la cepa W3110. Finalmente, las proteínas mutadas se reconstituyeron *in vitro* y purificaron, tal como se indica en Pérez-Boada, M. *et al.* (Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. Enzyme Microb. Technol. 30: 518-524. 2002).

Ejemplo 2

Caracterización de peroxidasas con actividad mejorada sobre diferentes fenoles

Se valoraron las constantes cinéticas de estado estacionario (K_m , constante de afinidad, expresada en concentración milimolar, mM; k_{cat} , constante catalítica, expresada en segundos⁻¹, s⁻¹; y k_{cat}/K_m , eficiencia catalítica, expresada en s⁻¹ mM⁻¹) de las diferentes variantes de VP de la realización anterior. Se utilizó el modelo cinético de Michaelis-Menten usando como sustratos compuestos fenólicos y no fenólicos y determinando por espectrofotometría la aparición del producto de oxidación o la desaparición del sustrato a una longitud de onda específica. A continuación se calculó el valor de actividad utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) correspondiente a dicha longitud de onda.

Todas las actividades enzimáticas se evaluaron como velocidades iniciales, tomando incrementos lineales (decrementos en el caso de la decoloración del *Reactive Black 5*) a 25°C en presencia de 0.1 mM H₂O₂ en tartrato sódico 0.1 M, a diferentes valores de pH (que se indican a continuación). La actividad sobre el Mn²⁺ se estimó por la formación del complejo Mn³⁺-tartrato (ϵ_{238} 6500 M⁻¹ cm⁻¹) a pH 5. La actividad sobre el alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibencílico) se estimó a pH 3 siguiendo la formación de veratraldehído (ϵ_{310} 9300 M⁻¹ cm⁻¹). Sobre el resto de sustratos la actividad se siguió a pH 3.5, tomando los siguientes coeficientes de extinción molar: *Reactive Black 5* (ϵ_{598} 30000 M⁻¹ cm⁻¹), guayacol (ϵ_{470} 26600 M⁻¹ cm⁻¹ referido al tetraguayacol como producto resultante de la reacción de oxidación, o ϵ_{470} 6650 M⁻¹ cm⁻¹ referido al guayacol), *para*-hidroquinona (ϵ_{247} 21000 M⁻¹ cm⁻¹), catecol (ϵ_{392} 1456 M⁻¹ cm⁻¹) y siringol (ϵ_{469} 55000 M⁻¹ cm⁻¹, correspondiente al dímero de cerulignona resultante; o ϵ_{469} 27500 M⁻¹ cm⁻¹ cuando se refiere a la concentración de siringol).

En la Tabla 3 se muestran los valores de eficiencia catalítica de las variantes mejoradas y de la peroxidasa nativa sobre los sustratos fenólicos mencionados anteriormente.

La eficiencia catalítica de las diferentes variantes respecto a la oxidación de sustratos no fenólicos (Mn²⁺, alcohol veratrílico y *Reactive Black 5*) se vio escasamente afectada por las mutaciones en el canal de acceso al hemo. Esta falta de efecto cuando se utilizaron sustratos de la VP que son oxidados en otros sitios catalíticos (tales como el alcohol veratrílico y el colorante *Reactive Black 5*, que son oxidados por transferencia electrónica en un residuo superficial, el Trp164) o que acceden al grupo hemo por otro canal distinto al modificado en la invención (el Mn²⁺) confirma que la mejora de las variantes de VP de la invención se logra por modificación del canal de acceso principal al grupo hemo y no por un efecto no específico.

Como puede observarse en la Tabla 3, los cambios en los aminoácidos Pro76, Phe142 y Lys215 no mejoraron la actividad de la peroxidasa sobre los fenoles ensayados en comparación con la actividad de la peroxidasa sin modificar (nativa). Sin embargo, la eliminación de la cadena lateral de Glu140 (sustitución por un residuo de glicina en la variante Glu140Gly) incrementó casi 9 veces la eficiencia oxidando el guayacol, y prácticamente duplicó la eficiencia de la enzima oxidando el siringol y la *para*-hidroquinona.

Además, cuando la mutación anterior en Glu140 se combinó con otra equivalente en Lys176 la eficiencia de la variante mejorada (Glu140Gly:Lys176Gly) en la oxidación de la *para*-hidroquinona, catecol y siringol aumentó aproximadamente 3, 2 y 9 veces, respectivamente en comparación al mutante sencillo (Glu140Gly), manteniéndose la misma eficiencia en la oxidación del guayacol. Una tercera mutación en Pro141 (dando lugar a la variante Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly) no resultó ventajosa ya que, aunque mejoró algo la eficiencia oxidando la *para*-hidroquinona, disminuyó la eficiencia en la oxidación del guayacol.

Los resultados anteriores muestran como cambios sencillos o dobles en residuos aminoácidos seleccionados del canal principal de acceso al hemo de la VP permiten obtener una peroxidasa mejorada con mayor eficiencia catalítica oxidando diferentes compuestos fenólicos.

Ejemplo 3

Tratamiento de una mezcla de fenoles proveniente de un efluente industrial con una peroxidasa de la invención

Se obtuvo efluente de una fábrica que utiliza madera de eucalipto como materia prima y el denominado proceso *kraft* para la eliminación de la lignina y obtención de la pasta de papel. El efluente corresponde a las primeras aguas de lavado de la pasta, que son especialmente ricas en fenoles derivados de la lignina. Se aislaron los compuestos fenólicos de bajo peso molecular por extracción líquido-líquido con metil-tert-butil éter a pH 6.

El tratamiento enzimático consistió en la incubación de 200 µg/mL del extracto fenólico con la variante Glu140Gly:Lys176Gly de la VP en una concentración 1 µM (la VP presenta una masa molecular de 35 kDa). La reacción se llevó a cabo a 25°C en tartrato sódico 0.1 M, pH 4.5, en presencia de un 5% de acetona (añadida para disolver completamente el extracto fenólico) y H₂O₂ a una concentración final de 0.1 mM en un volumen final de 1 mL. El mismo tratamiento se llevó a cabo utilizando la VP nativa (es decir no modificada) con objeto de identificar las mejoras obtenidas. En ambos casos la reacción se detuvo a los 5 minutos calentando la mezcla a 95°C durante 1 minuto, para lograr la desnaturalización de la enzima.

Las mezclas de reacción se evaporaron en una centrífuga Speed-Vac y el residuo se disolvió en acetona. Se evaporó la acetona y se disolvió el precipitado en cloroformo para disolver los compuestos fenólicos, identificando y cuantificando los mismos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El análisis se llevó a cabo en un equipo Varian Saturn 2000 con detector de trampa de iones, usando una columna capilar (DB-5HT de J & W Scientific) de 30 m x 0.25 mm y 0.1 µm de espesor de película y helio como gas portador. La temperatura de la columna se incrementó a 6°C/minuto desde 50°C (0.5 minutos) hasta 330°C (3 minutos). Los compuestos fueron identificados por sus patrones de fragmentación y por comparación de sus espectros con los recogidos en las librerías Wiley y NIST, y se cuantificaron utilizando una curva de calibración.

En la Figura 2A se muestran los fenoles de bajo peso molecular más abundantes en el efluente industrial analizado: siringaldehído (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído), acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona), vainillina

(3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) y acetoguaiacona (3-metoxi-4-hidroxiacetofenona). Estos cuatro compuestos son aldehídos o cetonas aromáticas de tipo fenólico derivados de las unidades siringilo y guayadillo de la lignina. Es posible observar que, mientras que la VP nativa sólo logró disminuir las concentraciones de los dos fenoles mayoritarios (siringaldehído y acetosiringona) en un 12% y un 5%, respectivamente (Figura 2B), la VP mejorada mediante la doble mutación (Glu140Gly:Lys176Gly) dio lugar a una disminución de aproximadamente el 85% en las concentraciones de los cuatro compuestos identificados (Figura 2C).

Los resultados obtenidos muestran que la peroxidasa mejorada no sólo posee mejores propiedades catalíticas cuando se ensaya sobre sustratos fenólicos puros sino que también es capaz de disminuir muy significativamente la concentración de los principales compuestos fenólicos presentes en una mezcla de origen industrial. El mecanismo de eliminación de estos fenoles en mezclas complejas no se ha investigado pero, dado que la acción de las peroxidases sobre dichos sustratos pasa por la formación de radicales libres de tipo fenoxilo, parece probable que discorra a través de reacciones de degradación parcial (pérdida de sustituyentes) y acoplamiento de radicales aromáticos pudiendo dar lugar a compuestos insolubles que precipitarían durante el tratamiento, tal como pudo apreciarse visualmente en algunos casos.

TABLA 1

Coordenadas atómicas de los residuos de la VP nativa que forman el canal principal de acceso al grupo hemo (Pro76, Ala77, Ala79, Gly80, Glu140, Pro141, Phe142, Lys176, Val177, Asn214 y Lys215) y del mismo grupo hemo, en la estructura cristalográfica de la variante alélica VPL2 (depositada en la base de datos PDB como 2BOQ). Las tres primeras columnas indican el número (569-580, 589-597, 1044-1070, 1309-1324, 1605-1621 y 2406-2448) y tipo de átomo (utilizando la nomenclatura habitualmente usada para los aminoácidos), las tres siguientes el tipo (PRO indica Prolina, ALA indica Alanina, GLY indica Glicina, GLU indica Ácido Glutámico, PRO indica Prolina, PHE indica Fenilalanina, LYS indica Lisina, VAL indica Valina y ASN indica Asparagina) y número de cada aminoácido (por su posición en la secuencia de la proteína madura) o cofactor (todos ellos de la cadena A), las tres siguientes las coordenadas cartesianas de cada átomo, las dos siguientes el factor de ocupación y el factor térmico, y la última columna el tipo de átomo (N, C, O ó Fe).

Atomo	Aminoácido					Coordenadas (x,y,z)			Factores		Tipo
-----	-----					-----			-----		----
ATOM	569	N	PRO	A	76	53.170	32.708	-10.635	1.00	15.53	N
ATOM	570	CA	PRO	A	76	52.169	32.209	-9.668	1.00	17.19	C
ATOM	571	C	PRO	A	76	51.790	33.218	-8.589	1.00	15.36	C
ATOM	572	O	PRO	A	76	50.583	33.317	-8.277	1.00	15.73	O
ATOM	573	CB	PRO	A	76	52.844	30.961	-9.050	1.00	17.98	C
ATOM	574	CG	PRO	A	76	53.786	30.481	-10.128	1.00	20.94	C
ATOM	575	CD	PRO	A	76	54.286	31.758	-10.830	1.00	17.30	C
ATOM	576	N	ALA	A	77	52.725	33.982	-8.043	1.00	13.98	N
ATOM	577	CA	ALA	A	77	52.359	34.914	-6.976	1.00	14.71	C
ATOM	578	C	ALA	A	77	51.501	36.098	-7.465	1.00	15.25	C
ATOM	579	O	ALA	A	77	50.935	36.825	-6.640	1.00	16.14	O
ATOM	580	CB	ALA	A	77	53.608	35.406	-6.246	1.00	16.44	C
ATOM	589	N	ALA	A	79	48.837	35.661	-9.436	1.00	14.94	N
ATOM	590	CA	ALA	A	79	47.507	35.148	-9.832	1.00	15.55	C
ATOM	591	C	ALA	A	79	46.445	36.198	-9.532	1.00	14.96	C
ATOM	592	O	ALA	A	79	46.448	36.804	-8.453	1.00	16.78	O

ES 2 342 701 A1

	ATOM	593	CB	ALA A	79	47.194	33.835	-9.112	1.00	15.73	C
	ATOM	594	N	GLY A	80	45.630	36.471	-10.555	1.00	15.94	N
5	ATOM	595	CA	GLY A	80	44.510	37.383	-10.439	1.00	16.63	C
	ATOM	596	C	GLY A	80	44.858	38.833	-10.701	1.00	17.79	C
	ATOM	597	O	GLY A	80	43.946	39.662	-10.814	1.00	20.48	O
10	ATOM	1044	N	GLU A	140	54.240	34.921	-0.873	1.00	12.25	N
	ATOM	1045	CA	GLU A	140	53.071	34.069	-1.081	1.00	12.51	C
	ATOM	1046	C	GLU A	140	52.471	33.685	0.267	1.00	10.94	C
	ATOM	1047	O	GLU A	140	53.190	33.651	1.247	1.00	11.31	O
15	ATOM	1048	CB	GLU A	140	53.438	32.800	-1.852	1.00	12.80	C
	ATOM	1049	CG	GLU A	140	54.105	33.186	-3.179	1.00	17.77	C
	ATOM	1050	CD	GLU A	140	54.922	32.055	-3.813	1.00	23.04	C
20	ATOM	1051	OE1	GLU A	140	55.959	31.587	-3.227	1.00	23.72	O
	ATOM	1052	OE2	GLU A	140	54.477	31.633	-4.894	1.00	21.96	O
	ATOM	1053	N	PRO A	141	51.178	33.418	0.320	1.00	10.85	N
25	ATOM	1054	CA	PRO A	141	50.515	33.192	1.617	1.00	10.70	C
	ATOM	1055	C	PRO A	141	50.899	31.883	2.287	1.00	11.89	C
	ATOM	1056	O	PRO A	141	50.593	31.752	3.478	1.00	12.48	O
	ATOM	1057	CB	PRO A	141	49.035	33.221	1.259	1.00	11.75	C
30	ATOM	1058	CG	PRO A	141	48.949	32.826	-0.157	1.00	11.33	C
	ATOM	1059	CD	PRO A	141	50.229	33.386	-0.795	1.00	11.38	C
	ATOM	1060	N	PHE A	142	51.562	30.990	1.560	1.00	11.30	N
35	ATOM	1061	CA	PHE A	142	52.109	29.748	2.150	1.00	12.56	C
	ATOM	1062	C	PHE A	142	53.609	29.863	2.441	1.00	13.73	C
	ATOM	1063	O	PHE A	142	54.230	28.881	2.848	1.00	14.77	O
40	ATOM	1064	CB	PHE A	142	51.848	28.578	1.219	1.00	11.91	C
	ATOM	1065	CG	PHE A	142	52.200	28.853	-0.213	1.00	13.27	C
	ATOM	1066	CD1	PHE A	142	53.528	28.709	-0.634	1.00	16.45	C
	ATOM	1067	CD2	PHE A	142	51.230	29.269	-1.130	1.00	14.94	C
45	ATOM	1068	CE1	PHE A	142	53.865	28.960	-1.997	1.00	16.82	C
	ATOM	1069	CE2	PHE A	142	51.566	29.510	-2.471	1.00	18.08	C
	ATOM	1070	CZ	PHE A	142	52.877	29.358	-2.879	1.00	16.92	C
50	ATOM	1309	N	LYS A	176	41.631	34.198	-5.464	1.00	14.49	N
	ATOM	1310	CA	LYS A	176	42.309	32.998	-5.977	1.00	14.53	C
	ATOM	1311	C	LYS A	176	42.704	32.003	-4.884	1.00	15.41	C
55	ATOM	1312	O	LYS A	176	42.878	30.819	-5.176	1.00	17.16	O
	ATOM	1313	CB	LYS A	176	43.541	33.370	-6.828	1.00	15.89	C
	ATOM	1314	CG	LYS A	176	43.272	34.313	-8.036	1.00	19.40	C
	ATOM	1315	CD	LYS A	176	42.303	33.620	-8.993	1.00	24.08	C
60	ATOM	1316	CE	LYS A	176	41.901	34.616	-10.061	1.00	27.75	C
	ATOM	1317	NZ	LYS A	176	41.059	33.939	-11.091	1.00	33.61	N
	ATOM	1318	N	VAL A	177	42.782	32.445	-3.633	1.00	14.30	N
65	ATOM	1319	CA	VAL A	177	43.114	31.549	-2.546	1.00	14.59	C
	ATOM	1320	C	VAL A	177	42.081	30.436	-2.444	1.00	14.34	C

ES 2 342 701 A1

	ATOM	1321	O	VAL A 177	42.442	29.254	-2.373	1.00	16.01	O
	ATOM	1322	CB	VAL A 177	43.228	32.315	-1.198	1.00	13.25	C
5	ATOM	1323	CG1	VAL A 177	43.450	31.326	-0.020	1.00	14.88	C
	ATOM	1324	CG2	VAL A 177	44.345	33.328	-1.286	1.00	16.16	C
	ATOM	1605	N	ASN A 214	42.711	24.562	1.023	1.00	19.55	N
10	ATOM	1606	CA	ASN A 214	43.383	25.450	0.078	1.00	18.03	C
	ATOM	1607	C	ASN A 214	44.767	25.828	0.580	1.00	16.09	C
	ATOM	1608	O	ASN A 214	44.935	26.223	1.730	1.00	16.60	O
	ATOM	1609	CB	ASN A 214	42.547	26.716	-0.145	1.00	17.31	C
15	ATOM	1610	CG	ASN A 214	41.185	26.404	-0.746	1.00	18.63	C
	ATOM	1611	OD1	ASN A 214	41.096	25.883	-1.874	1.00	20.33	O
	ATOM	1612	ND2	ASN A 214	40.146	26.632	0.002	1.00	18.68	N
20	ATOM	1613	N	LYS A 215	45.746	25.786	-0.305	1.00	15.79	N
	ATOM	1614	CA	LYS A 215	47.107	26.126	0.059	1.00	15.00	C
	ATOM	1615	C	LYS A 215	47.183	27.616	0.414	1.00	14.89	C
25	ATOM	1616	O	LYS A 215	46.610	28.464	-0.300	1.00	16.00	O
	ATOM	1617	CB	LYS A 215	47.998	25.836	-1.155	1.00	16.56	C
	ATOM	1618	CG	LYS A 215	49.430	25.957	-0.856	1.00	17.97	C
	ATOM	1619	CD	LYS A 215	50.278	25.454	-2.024	1.00	20.90	C
30	ATOM	1620	CE	LYS A 215	51.748	25.613	-1.731	1.00	23.84	C
	ATOM	1621	NZ	LYS A 215	52.527	25.245	-2.985	1.00	29.43	N
	HETATM	2406	FE	HEM A1320	48.469	41.232	0.274	1.00	10.09	FE
35	HETATM	2407	CHA	HEM A1320	45.591	40.503	-1.474	1.00	11.00	C
	HETATM	2408	CHB	HEM A1320	49.287	37.873	0.239	1.00	10.43	C
	HETATM	2409	CHC	HEM A1320	51.607	41.902	1.477	1.00	10.56	C
40	HETATM	2410	CHD	HEM A1320	48.030	44.613	-0.450	1.00	9.10	C
	HETATM	2411	N A	HEM A1320	47.639	39.500	-0.492	1.00	9.74	N
	HETATM	2412	C1A	HEM A1320	46.418	39.442	-1.142	1.00	10.83	C
	HETATM	2413	C2A	HEM A1320	46.118	38.051	-1.456	1.00	9.86	C
45	HETATM	2414	C3A	HEM A1320	47.162	37.350	-0.983	1.00	10.59	C
	HETATM	2415	C4A	HEM A1320	48.101	38.204	-0.357	1.00	10.41	C
	HETATM	2416	CMA	HEM A1320	47.312	35.823	-1.073	1.00	11.69	C
50	HETATM	2417	CAA	HEM A1320	44.862	37.567	-2.179	1.00	10.64	C
	HETATM	2418	CBA	HEM A1320	45.127	37.428	-3.698	1.00	12.26	C
	HETATM	2419	CGA	HEM A1320	43.930	36.721	-4.320	1.00	13.12	C
55	HETATM	2420	O1A	HEM A1320	43.799	35.503	-4.135	1.00	16.21	O
	HETATM	2421	O2A	HEM A1320	43.102	37.362	-4.956	1.00	14.46	O
	HETATM	2422	N B	HEM A1320	50.172	40.092	0.765	1.00	9.81	N
	HETATM	2423	C1B	HEM A1320	50.224	38.722	0.785	1.00	10.17	C
60	HETATM	2424	C2B	HEM A1320	51.443	38.359	1.461	1.00	9.72	C
	HETATM	2425	C3B	HEM A1320	52.070	39.474	1.845	1.00	11.57	C
	HETATM	2426	C4B	HEM A1320	51.290	40.560	1.372	1.00	9.21	C
65	HETATM	2427	CMB	HEM A1320	51.876	36.906	1.693	1.00	11.62	C
	HETATM	2428	CAB	HEM A1320	53.382	39.518	2.614	1.00	12.57	C

ES 2 342 701 A1

	HETATM 2429	CBB HEM A1320	53.793	40.508	3.384	1.00	20.70	C
	HETATM 2430	N C HEM A1320	49.657	42.979	0.368	1.00	9.34	N
5	HETATM 2431	C1C HEM A1320	50.897	43.007	0.987	1.00	9.23	C
	HETATM 2432	C2C HEM A1320	51.338	44.375	0.967	1.00	10.51	C
	HETATM 2433	C3C HEM A1320	50.353	45.123	0.423	1.00	10.19	C
10	HETATM 2434	C4C HEM A1320	49.278	44.256	0.042	1.00	9.91	C
	HETATM 2435	CMC HEM A1320	52.684	44.832	1.525	1.00	12.21	C
	HETATM 2436	CAC HEM A1320	50.406	46.644	0.270	1.00	12.57	C
15	HETATM 2437	CBC HEM A1320	50.001	47.221	-0.823	1.00	16.29	C
	HETATM 2438	N D HEM A1320	47.115	42.338	-0.850	1.00	10.29	N
	HETATM 2439	C1D HEM A1320	47.026	43.743	-0.790	1.00	9.35	C
	HETATM 2440	C2D HEM A1320	45.675	44.129	-1.096	1.00	9.82	C
20	HETATM 2441	C3D HEM A1320	44.948	42.891	-1.442	1.00	11.87	C
	HETATM 2442	C4D HEM A1320	45.911	41.816	-1.279	1.00	9.55	C
	HETATM 2443	CMD HEM A1320	45.155	45.551	-1.046	1.00	10.48	C
25	HETATM 2444	CAD HEM A1320	43.478	42.818	-1.873	1.00	10.41	C
	HETATM 2445	CBD HEM A1320	43.305	42.561	-3.371	1.00	12.26	C
	HETATM 2446	CGD HEM A1320	41.857	42.434	-3.714	1.00	15.51	C
30	HETATM 2447	O1D HEM A1320	41.615	41.890	-4.835	1.00	18.95	O
	HETATM 2448	O2D HEM A1320	40.961	42.790	-2.947	1.00	13.61	O

TABLA 2

Parejas de oligonucleótidos cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida mediante PCR para la obtención de las variantes mutadas de la VP (variante alélica VPL2). Los codones correspondientes a cada uno de los aminoácidos modificados aparecen subrayados y los nucleótidos cambiados se muestran en negrita. D corresponde a la secuencia directa de la hebra codificante de ADNc y RC a la secuencia reversa y complementaria de la misma región. En algunos casos se emplearon genes ya mutados (incluyendo mutaciones simples previas) como ADN “molde” en las reacciones de PCR. En cada oligonucleótido se indica el número del primer y último nucleótido.

Mutaciones	Oligonucleótidos cebadores
(ADN molde en reacción de PCR)	
Pro76Gly	D: 204-CGACACCATGAGACTAATTT CGG CGCCAATGCTGGCATCG-244
(gen enzima nativa)	RC: 244-CGATGCCAGCATTTGGC CCG GAAATTAGTCTCAATGGTGTTCG-204
Glu140Gly	D: 402-GGACCACCTCGTGCCAG GGA CCTTTTGATTCTGTG-436
(gen enzima nativa)	RC: 436-CAACAGAATCAAAAG TCC TGGCACGAGGTGGTCC-402
Glu140Gly:Lys176Gly	D: 514-GCCGCTGCCGAC GGA AGTTGACCCATCGATTCTTGG-548
(gen variante Glu140Gly)	RC: 548-CCAGGAATCGATGGGTCAAC TCC GTCGGCAGCGGC-514
Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly	D: 514-GCCGCTGCCGAC GGA AGTTGACCCATCGATTCTTGG-548
(gen variante Glu140Gly:Lys176Gly)	RC: 548-CCAGGAATCGATGGGTCAAC TCC GTCGGCAGCGGC-514

	Pro141Gly	D: 405-CCACCTCGTGCCAGAG <u>GG</u> TTTTGATTCTGTTGACTCC-441
	(gen enzima nativa)	RC: 441-GGAGTCAACAGAATCAAAA <u>CC</u> CTCTGGCACGAGGTGG-405
5	Glu140Gly:Pro141Gly	D: 400-CCGGACCACCTCGTGCCAG <u>GGCGG</u> TTTTGATTCTGTTGACTCC-441
	(gen enzima nativa)	RC: 441-GGAGTCAACAGAATCAAAA <u>CCGC</u> CTGGCACGAGGTGGTCCGG-400
	Phe142Gly	D: 402-GGACCACCTCGTGCCAGAGCCT <u>GG</u> TGATTCTGTTGACTCC-441
10	(gen enzima nativa)	RC: 441-GGAGTCAACAGAATCA <u>CC</u> AGGCTCTGGCACGAGGTGGTCC-402
	Lys176Asp	D: 514-GCCGCTGCCGAC <u>GAC</u> GTTGACCCATCGATTCC-545
	(gen enzima nativa)	RC: 545-GGAATCGATGGGTCAAC <u>GTC</u> GTCGGCAGCGGC-514
15	Lys176Gly	D: 514-GCCGCTGCCGAC <u>GGA</u> GTTGACCCATCGATTCCCTGG-548
	(gen enzima nativa)	RC: 548-CCAGGAATCGATGGGTCAAC <u>TCC</u> GTCGGCAGCGGC-514
	Lys215Gly	D: 624-CCCAGGCACTGCTGACAAC <u>GGC</u> GGAGAAGCCCAATCTCC-662
	(gen enzima nativa)	RC: 662-GGAGATTGGGCTTCTCC <u>GGC</u> GTTGTGTCAGCAGTGCCTGGG-624
20	Lys215Gln	D: 624-CCCAGGCACTGCTGACAAC <u>CAG</u> GGAGAAGCCCAATCTCC-662
	(gen enzima nativa)	RC: 662-GGAGATTGGGCTTCTCC <u>TGC</u> GTTGTGTCAGCAGTGCCTGGG-624

TABLA 3

30 Eficiencia catalítica ($s^{-1} mM^{-1}$) de distintas variantes de VP según la invención y de la VP nativa (sin modificar) en su oxidación de *para*-hidroquinona, catecol (*orto*-hidroquinona), guayacol (2-metoxifenol) y siringol (2,6-dimetoxifenol). Los valores, indican media \pm límites de confianza del 95%. Asp indica Ácido Aspártico, Gln indica Glutamina, Glu indica Ácido Glutámico, Phe indica Fenilalanina, Gly indica Glicina, Lys indica Usina y Pro indica Prolina. Se indica para cada sustitución la naturaleza del aminoácido sustituido, la posición del mismo en la secuencia aminoacídica
35 de la proteína madura y el aminoácido que lo sustituye. N.D. indica "no determinado".

	<i>p</i> -Hidroquinona	Catecol	Guayacol	Siringol	
40	VP nativa	49 ± 1	37 ± 1	2.0 ± 0.0	2.8 ± 0.1
	Pro76Gly	29 ± 1	21 ± 1	1.6 ± 0.0	N.D.
45	Glu140Gly	87 ± 3	38 ± 1	17.6 ± 1.1	7.8 ± 0.3
	Pro141Gly	97 ± 3	15 ± 1	1.3 ± 0.0	1.9 ± 0.0
	Phe142Gly	51 ± 2	15 ± 1	1.6 ± 0.0	N.D.
50	Lys176Gly	67 ± 4	22 ± 1	2.0 ± 0.0	6.4 ± 0.2
	Lys215Gly	31 ± 2	20 ± 1	2.0 ± 0.2	2.9 ± 0.2
	Glu140Gly:Pro141Gly	56 ± 3	10 ± 0	0.5 ± 0.0	3.8 ± 0.1
55	Glu140Gly:Lys176Gly	133 ± 1	71 ± 2	17.1 ± 1.1	22.6 ± 0.8
	Glu140Gly:Pro141Gly:Lys176Gly	203 ± 14	29 ± 1	4.2 ± 0.0	23.8 ± 1.6
	Lys176Asp	60 ± 1	51 ± 2	4.2 ± 0.2	N.D.
60	Lys215Gln	25 ± 2	20 ± 1	1.6 ± 0.0	N.D.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de peroxidasas de hongos con mayor eficiencia catalítica para oxidar compuestos fenólicos que las peroxidasas naturales, **caracterizado** por que se modifican los residuos de aminoácidos que forman el canal principal de acceso de los sustratos hasta el grupo hemo.
2. Procedimiento según la reivindicación anterior **caracterizado** por que las modificaciones de los residuos aminoácidos del canal del hemo se diseñan tras analizar la estructura molecular real o teórica de la enzima, o tras un simple alineamiento de la secuencia de aminoácidos; e incluyen mutaciones simples (sustitución de un sólo residuo aminoácido) o múltiples (sustitución de varios residuos de aminoácidos) con el propósito de modificar el tamaño del canal de acceso al hemo, su carga electrostática o una combinación de ambos.
3. Procedimiento según la reivindicación anterior **caracterizado** por que las modificaciones de los residuos aminoácidos del canal del hemo incluyen el acortamiento o la eliminación de cadenas laterales, con el propósito de ampliar dicho canal.
4. Procedimiento para la mejora de diferentes peroxidasas según la reivindicación 2 **caracterizado** por que las modificaciones de los residuos aminoácidos del canal del hemo incluyen la modificación de la carga electrostática y se lleva a cabo por sustitución de residuos ácidos por básicos y viceversa, así como por la sustitución de los tipos anteriores por residuos neutros (sin carga), o la sustitución de este último tipo de residuos neutros por residuos cargados.
5. Procedimiento para la mejora de diferentes peroxidasas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** por que las modificaciones de los residuos aminoácidos del canal del hemo se consigue mediante el procedimiento de mutagénesis dirigida, basado en el diseño racional y la mutagénesis puntual de uno o varios residuos aminoácidos mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o por el procedimiento de mutagénesis saturante combinatoria (basado en la sustitución de residuos seleccionados por todos los posibles aminoácidos en todas las combinaciones posibles).
6. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por que las modificaciones de los residuos aminoácidos del canal del hemo se consigue mediante el procedimiento denominado de evolución dirigida, basado en ciclos sucesivos de mutación al azar y selección de los mejores transformantes utilizando un sistema de expresión adecuado, así como mediante la aplicación de este método conjuntamente con el de mutagénesis dirigida o saturante mencionadas en la reivindicación anterior.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** por que las peroxidasas mejoradas se obtienen tras expresión del ADNc o ADN genómico que codifica cualquiera de estas peroxidasas en un sistema de expresión de tipo eucariota como especies fúngicas de los géneros *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pycnoporus*, *Pichia* y *Saccharomyces*, especies de plantas o cultivos de células de insectos.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** por que las peroxidasas mejoradas se obtienen tras expresión del ADNc o ADN genómico que codifica cualquiera de estas peroxidasas en un sistema de expresión de tipo procariota como *Escherichia coli* y especies del género *Bacillus*.
9. Peroxidasa (EC 1.11.1) fúngica **caracterizada** por que, respecto a su forma natural, presenta al menos una modificación de uno de los residuos de aminoácidos que forman el canal principal de acceso de los sustratos hasta el grupo hemo y por que presenta una mayor eficiencia catalítica para oxidar compuestos fenólicos.
10. Peroxidasa según la reivindicación anterior **caracterizada** por que su forma natural pertenece al grupo formado por las enzimas: i) clasificadas como peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16); ii) clasificadas como lignina peroxidasa (EC 1.11.1.13); iii) clasificadas como manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.14); iv) clasificadas como simplemente peroxidasa (EC 1.11.1.7); y v) con una denominación no recogida en la clasificación de enzimas.
11. Peroxidasa según la reivindicación anterior **caracterizada** por que la forma natural procede de un hongo perteneciente al grupo de los basidiomicetos.
12. Peroxidasa según la reivindicación anterior **caracterizada** por que la forma natural procede de una especie cualquiera de los géneros pertenecientes al grupo formado formado por: *Agaricus*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Dichomitus*, *Ganoderma*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Pleurotus*, *Pycnoporus* y *Trametes*.
13. Peroxidasa según la reivindicación anterior **caracterizada** por que la forma natural procede de una especie del grupo formado por: *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium*.
14. Peroxidasa según la reivindicación anterior **caracterizada** por que la forma natural procede de una cepa fúngica perteneciente al grupo formado por: CBS 613.91 (*Pleurotus eryngii*), CBS 507.85 (*Pleurotus pulmonarius*), CBS 411.71 (*Pleurotus ostreatus*), CBS 230.93 (*Bjerkandera adusta*), BOS55 de la Universidad de Wageningen (*Bjerkandera* sp), RP-78 del JGI (*Phanerochaete chrysosporium*) y CSP #776985 del JGI (*Pleurotus ostreatus*).

15. Peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11 derivada de las secuencias de aminoácidos depositadas en las bases de datos de proteínas pertenecientes al grupo formado por: 1906181 A, AAA33736, AAA33738, AAA33739, AAA33741, AAA33744, AAA33745, AAA34049, AAA53109, AAA56852, AAA84396, AAB03480, AAB39652, AAB63460, AAD01401, AAD01404, AAD43581, AAD45725, AAD46494, AAD54310, AAF31329, AAF31330, AA047909, AA061784, AAU82081, BAD52441, ABB77243, ABB77244, BAA33449, BAA88392, BAC06185, BAC06186, BAC06187, CAA33621, CAA50060, CAA53333, CAA54398, CAA83147, CAA83148, CAA91043, CAB51617, CAC84573, CAC85963, CAD56164, CAG27835, CAJ01576, AAZ04666 y P20010.

16. Peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11 **caracterizada** por que su secuencia de aminoácidos presenta al menos un 40% de identidad, y preferentemente más de un 50% de identidad, con alguna de las secuencias indicadas en la reivindicación anterior.

17. Peroxidasa según la reivindicación 13, **caracterizada** por que su forma natural corresponde a una peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii*.

18. Peroxidasa según la reivindicación anterior, **caracterizada** por que, antes de su modificación, su secuencia comprende la secuencia SEQ ID NO.2.

19. Peroxidasa según la reivindicación 18, **caracterizada** por que las modificaciones comprenden la sustitución de al menos un aminoácido del grupo siguiente: Prolina en la posición 76, Ácido Glutámico en la posición 140, Prolina en la posición 141, Fenilalanina en la posición 142, Usina en la posición 176 y Usina en la posición 215.

20. Peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 18 y 19, **caracterizada** por que las modificaciones de la secuencia SEQ ID NO.2 comprenden al menos una sustitución seleccionada del grupo siguiente: Ácido Glutámico de la posición 140 por Glicina, Prolina de la posición 141 por Glicina, Usina de la posición 176 por Glicina, Usina de la posición 176 por Ácido Aspártico, Usina de la posición 215 por Glutamina o una combinación de dos o más de dichas sustituciones.

21. Polinucleótido capaz de codificar una peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20.

22. Polinucleótido según la reivindicación anterior, **caracterizado** por que resulta de la modificación de una secuencia de nucleótidos que, antes de dicha modificación, comprende la secuencia SEQ ID NO. 1.

23. Polinucleótido según la reivindicación 21, **caracterizado** por que resulta de la modificación de una secuencia de nucleótidos que, antes de dicha modificación, comprende una secuencia con al menos un 30% de identidad, y preferentemente más de un 40% de identidad, con la secuencia SEQ ID NO.1, o polinucleótido sintético preparado de acuerdo con dicha secuencia modificada.

24. Vector recombinante que comprende un polinucleótido definido según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23.

25. Célula transformada, **caracterizada** por que es capaz de producir una peroxidasa definida según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20.

26. Uso de la peroxidasa definida según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20 en procesos industriales o medioambientales de oxidación de compuestos fenólicos.

27. Uso según la reivindicación anterior **caracterizado** por que el compuesto fenólico pertenece al grupo siguiente: metoxifenoles, hidroquinonas o mezclas complejas de fenoles incluyendo efluentes industriales.

28. Uso según las reivindicaciones 26 ó 27 **caracterizado** por que las peroxidasas se aplican directamente, o formando parte de sistemas enzima-mediador, en la transformación de la biomasa lignocelulósica, el tratamiento de efluentes, la modificación de ligninas, la polimerización de fenoles, la obtención de biocombustibles, la funcionalización de fibras de celulosa, la coloración de fibras textiles, la síntesis química, el procesamiento de alimentos y bebidas, la producción de detergentes enzimáticos, la obtención de kits analíticos y la fabricación de biosensores.

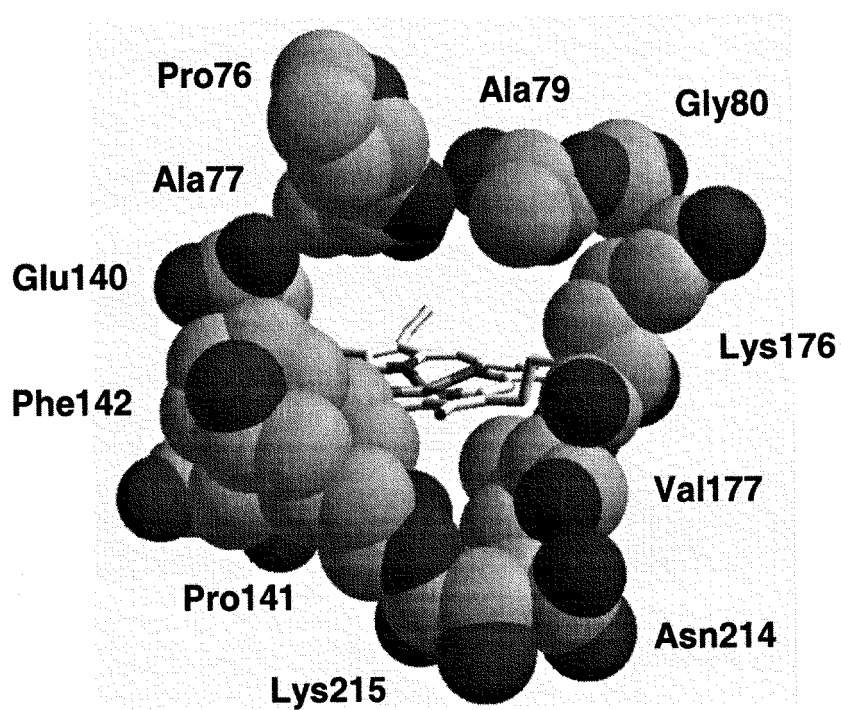


FIG. 1

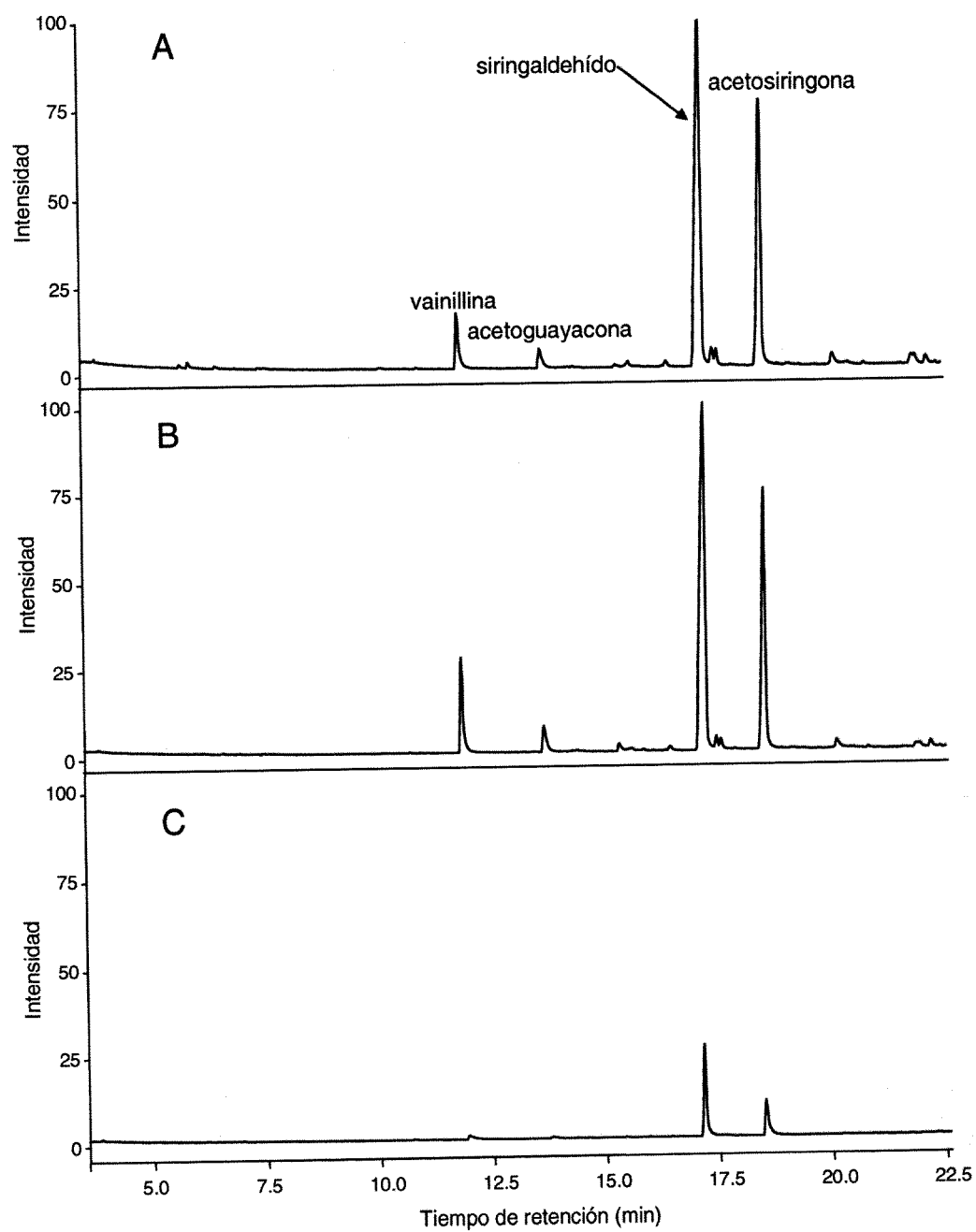


FIG. 2

ES 2 342 701 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de investigaciones Científicas

5 <120> “Peroxidasas mejoradas”

<130> ES1641.55

10 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 993

<212> DNA

20 <213> *Pleurotus eryngii*

<400> 1

gcaacttgcg acgacggacg caccaccgca aatgctgcat gttgcattct gttccccatc
60

25 ctcgatgaca tccaagaaaa cctcttcgac ggtgcccagt gtggagaaga ggtgcacgag
120

tcccttcggt tgactttcca cgatgcaatc ggtttctctc ctactttagg cggaggagga
180

30 gctgacggtt ccatcatcgc gttcgacacc attgagacta atttccccgc caatgctggc
240

atcgatgaaa tcgtcagtg ctcagaagcca ttcgtggcta aacacaacat ctccgccggc
35 300

gacttcattc aatttgctgg cgccgttggg gtctccaact gccctgggtg tgtcaggatt
360

40 cctttcttct tgggtcgccc ggatgccgtg gccgcctccc cggaccacct cgtgccagag
420

ccttttgatt ctgttgactc cattcttgcc agaatgggtg acgcaggctt cagtcccgtc
480

45 gaggttggtt ggctcctggc ttcgcactcc attgccgctg ccgacaaggt tgacccatcg
540

attcctggaa cgccattcga ttcaaccccc ggagtttttg attctcaatt cttcatcgaa
600

50 acgcaactta aaggcagact cttcccaggc actgctgaca acaagggaga agcccaatct
660

ccattgcaag gagagatcag gcttcagtcc gatcacttgt tggctagaga cccccagact
720

55 gcctgcgaat ggcagtccat ggtaacaac caaccgaaga ttcagaaccg tttcgctgct
780

accatgtcga agatggctct tcttggccaa gacaagacca aattgattga ctgttccgat
840

60 gttatcccca cccctcctgc cttgtcgga gcggccact taccggcggg attttctctt
900

agcgatgtag agcaagcgtg cgccgcgacg cttttccctg ctcttactgc tgacccaggc
960

65 ccagtaacct ccgtccctcc cgtccctgga tcg
993

ES 2 342 701 A1

<210> 2

<211> 331

<212> PRT

5 <213> *Pleurotus eryngii*

<400> 2

10	Ala	Thr	Cys	Asp	Asp	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	Asn	Ala	Ala	Cys	Cys	Ile
	1				5					10					15	
	Leu	Phe	Pro	Ile	Leu	Asp	Asp	Ile	Gln	Glu	Asn	Leu	Phe	Asp	Gly	Ala
15				20					25					30		
	Gln	Cys	Gly	Glu	Glu	Val	His	Glu	Ser	Leu	Arg	Leu	Thr	Phe	His	Asp
			35					40					45			
20	Ala	Ile	Gly	Phe	Ser	Pro	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser
		50					55					60				
25	Ile	Ile	Ala	Phe	Asp	Thr	Ile	Glu	Thr	Asn	Phe	Pro	Ala	Asn	Ala	Gly
	65					70					75					80
	Ile	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Ala	Gln	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Lys	His	Asn
30					85					90					95	
	Ile	Ser	Ala	Gly	Asp	Phe	Ile	Gln	Phe	Ala	Gly	Ala	Val	Gly	Val	Ser
35				100					105					110		
	Asn	Cys	Pro	Gly	Gly	Val	Arg	Ile	Pro	Phe	Phe	Leu	Gly	Arg	Pro	Asp
			115					120					125			
40	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Pro	Asp	His	Leu	Val	Pro	Glu	Pro	Phe	Asp	Ser
		130					135					140				
45	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Arg	Met	Gly	Asp	Ala	Gly	Phe	Ser	Pro	Val
	145					150					155					160
	Glu	Val	Val	Trp	Leu	Leu	Ala	Ser	His	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys
50					165					170					175	
	Val	Asp	Pro	Ser	Ile	Pro	Gly	Thr	Pro	Phe	Asp	Ser	Thr	Pro	Gly	Val
55				180					185					190		
	Phe	Asp	Ser	Gln	Phe	Phe	Ile	Glu	Thr	Gln	Leu	Lys	Gly	Arg	Leu	Phe
			195					200					205			
60	Pro	Gly	Thr	Ala	Asp	Asn	Lys	Gly	Glu	Ala	Gln	Ser	Pro	Leu	Gln	Gly
		210					215					220				
65	Glu	Ile	Arg	Leu	Gln	Ser	Asp	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Thr

ES 2 342 701 A1

	225				230					235					240	
5	Ala	Cys	Glu	Trp	Gln 245	Ser	Met	Val	Asn	Asn 250	Gln	Pro	Lys	Ile	Gln 255	Asn
10	Arg	Phe	Ala	Ala 260	Thr	Met	Ser	Lys	Met 265	Ala	Leu	Leu	Gly	Gln 270	Asp	Lys
15	Thr	Lys	Leu 275	Ile	Asp	Cys	Ser	Asp 280	Val	Ile	Pro	Thr	Pro 285	Pro	Ala	Leu
20	Val	Gly 290	Ala	Ala	His	Leu	Pro 295	Ala	Gly	Phe	Ser	Leu 300	Ser	Asp	Val	Glu
25	Gln 305	Ala	Cys	Ala	Ala	Thr 310	Pro	Phe	Pro	Ala	Leu 315	Thr	Ala	Asp	Pro	Gly 320
30	Pro	Val	Thr	Ser	Val 325	Pro	Pro	Val	Pro	Gly 330	Ser					
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 342 701

⑫ Nº de solicitud: 200801292

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 06.05.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2006114616 A1 (UNIVERSITY OF SUSSEX [GB]) 02.11.2006, páginas 1-3; página 7, líneas 9-10; 20-22; página 8, líneas 1-7; página 10, líneas 28-30; página 12, líneas 19-23; página 18, línea 1; página 30, líneas 11-17, 26-28; página 31, líneas 27-29; página 36, líneas 5-21.	1-5, 8-16, 21, 23-26
Y		6, 7
Y	WO 2007020428 A1 (UNIVERSITY OF SUSSEX [GB]) 22.02.2007, páginas 2, 6-7, 9, 19.	6
Y	WO 1993024618 A1 (NOVO NORDISK A/S [DK]) 09.12.1993, páginas 2, 21-22.	7
A	RUIZ-DUEÑAS FJ et al. "Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in Pleurotus eryngii versatile peroxidase". Biochemistry. 2008, Vol 47, páginas 1685-1695, todo el documento.	1-5, 8-25
A	CHERRY JR et al. "Directed evolution of a fungal peroxidase". Nature Biotechnology. 1999, Vol 17, páginas 379-384, todo el documento	1-5, 7, 9-11, 15, 16, 21, 24, 26
A	CONESA A et al. "Fungal peroxidases: molecular aspects and applications". Journal of Biotechnology. 2002, Vol 93, páginas 143-158, todo el documento.	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.06.2010

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/08 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

D21C 9/10 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, D21C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PATENTSCOPE, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED CENTRAL, PUBCHEM

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	6-7, 14-15, 17-20, 22, 27-28	SÍ
	Reivindicaciones	1-5, 8-13, 16, 21, 23-26	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	17-20, 22, 27-28	SÍ
	Reivindicaciones	1-16, 21, 23-26	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006114616 A1	02-11-2006
D02	WO 2007020428 A1	22-02-2007
D03	WO 1993024618 A1	09-12-1993
D04	RUIZ-DUEÑAS FJ et al. Biochemistry. 2008, Vol 47, páginas 1685-1695.	18-01-2008
D05	CHERRY JR et al. Nature Biotechnology. 1999, Vol 17, páginas 379-384.	1999
D06	CONESA A et al. Journal of Biotechnology. 2002, Vol 93, páginas 143-158.	2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un procedimiento de obtención de peroxidasas fúngicas mutantes, en las cuales se han modificado aminoácidos del canal de acceso al hemo, y que presentan mayor eficiencia catalítica para oxidar compuestos fenólicos que las correspondientes enzimas salvajes (reivindicaciones 1-16). En particular, la solicitud divulga peroxidasas modificadas por el citado procedimiento que derivan de la peroxidasa versátil de "Pleurotus eryngii" (reivindicaciones 17-20). Se incluyen asimismo polinucleótidos, vectores y hospedadores para la expresión de peroxidasas recombinantes que incorporan las mencionadas mutaciones (reivindicaciones 21-25), y el uso de las peroxidasas mejoradas en procesos industriales y medioambientales (reivindicaciones 26-28).

El documento D01 divulga procedimientos de obtención de peroxidasas fúngicas recombinantes, útiles en la degradación de lignina y como blanqueantes, en las que se han mutado ciertos residuos aminoacídicos por sustitución. En particular, divulga la mutación de un aminoácido del canal de acceso de los sustratos al grupo hemo de una lignina peroxidasa de "Phanerochaete chrysosporium" que tiene como consecuencia un aumento de la eficiencia catalítica de esta enzima frente a un colorante fenólico. Además, este documento abarca los polinucleótidos y vectores para llevar a cabo la expresión de las peroxidasas recombinantes modificadas en un sistema heterólogo procarionta (ver , páginas 1-3; página 7, líneas 9-10; 20-22; página 8, líneas 1-7; página 10, líneas 28-30; página 12, líneas 19-23; página 18, línea 1; página 30, líneas 11-17, 26-28; página 31, líneas 27-29; página 36, líneas 5-21).

El documento D02 divulga peroxidasas vegetales y fúngicas que han sido mutadas en aminoácidos puntuales. Dichas mutaciones comprenden la sustitución de uno de los residuos del canal de acceso al hemo, la cual produce un aumento de la actividad catalítica de una peroxidasa vegetal frente a sustratos fenólicos. D02 divulga asimismo la obtención de las peroxidasas modificadas como proteínas recombinantes que incorporan mutaciones llevadas a cabo mediante técnicas que comprenden la evolución dirigida (ver páginas 2, 6-7, 9, 19).

El documento D03 se refiere a variantes de peroxidasas fúngicas con mayor estabilidad frente al peróxido de hidrógeno que son útiles como blanqueantes. En un caso particular, estas peroxidasas se obtienen a través de modificaciones que comprenden la sustitución de aminoácidos que forman parte del canal de acceso al hemo. Asimismo, D03 divulga métodos de obtención de las enzimas mutadas empleando técnicas de ADN recombinante. Dichas técnicas comprenden la expresión de vectores, que incorporan los polinucleótidos que codifican las enzimas, en distintos hospedadores y en particular en hongos (ver páginas 2, 21-22).

El documento D04, del cual son autores los inventores, divulga una peroxidasa versátil de "Pleurotus eryngii " modificada mediante mutagénesis dirigida en seis residuos de aminoácidos que se encuentran en el entorno de un residuo de triptófano directamente relacionado con la catálisis. Asimismo, se aborda el efecto de dichas modificaciones en las propiedades cinéticas de la enzima.

Por su parte, D05 divulga el empleo de técnicas de evolución dirigida para obtener peroxidasas mutantes de "Coprinus cinereus" utilizables como componente blanqueante de detergentes por su capacidad para oxidar colorantes.

Hoja adicional

Por último, D06 aporta una revisión de los aspectos moleculares y los usos de distintas peroxidasas fúngicas. Asimismo, divulga peroxidasas mutantes que pueden ser obtenidas por expresión en diferentes sistemas heterólogos.

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1. Reivindicaciones 1-28.

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica, ya que anticipa una lignina peroxidasa mutante cuya forma natural es producida por el hongo basidiomiceto "*Phanerochaete chrysosporium*" y que presenta una similitud de secuencia superior al 40% respecto a las secuencias AAA33744, AAA33745, AAB39652 y AAU82081 de la solicitud. Esta variante de la lignina peroxidasa posee una mayor eficiencia catalítica frente a un colorante azo cargado negativamente que es un derivado fenólico. La enzima modificada incorpora la mutación E146G, que produce el agrandamiento del canal de acceso al hemo y que supone a su vez la sustitución de la cadena lateral del ácido glutámico con carga negativa por el átomo de hidrógeno de la glicina, lo cual hace disminuir el potencial electrostático negativo del canal.

Por otra parte, la metodología seguida en D01 para la obtención de las peroxidasas modificadas es la misma que la empleada por los inventores. Dicha metodología comprende la comparación de secuencias de peroxidasas para determinar los residuos aminoacídicos a sustituir, la mutagénesis dirigida puntual mediante PCR de un polinucleótido que, antes de ser mutado, presenta una similitud de secuencia del 63% respecto a la SEQ NO:1 de la solicitud, y la expresión en "*E.coli*" de vectores que comprenden dicho polinucleótido. Por último, D01 anticipa el uso industrial y medioambiental de las peroxidasas modificadas por cuanto éstas presentan mayor eficiencia biocatalítica en la oxidación de tintes.

En consecuencia, considerando que el objeto reivindicado se anticipa de forma idéntica en D01, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-5, 8-16, 21, 23-26, no cumple con el requisito de novedad. Por el contrario, las reivindicaciones 6-7, 14-15, 17-20, 22, 27-28 sí satisfacen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 6-7, 14-15, 17-20, 22, 27-28.

Una diferencia del documento D01 con la presente solicitud consiste en la modificación de las peroxidasas por evolución dirigida (reivindicación 6), no empleándose dicha técnica en D01. Sin embargo, este elemento particular aparece en el documento D02, que anticipa peroxidasas fúngicas mutadas obtenidas por técnicas de ADN recombinante análogas a las de D01 y la solicitud. Por ello, se considera que la aplicación de la técnica de evolución dirigida como alternativa para la generación de las enzimas mutantes resultaría obvia para un experto en la materia a la luz de lo divulgado en D01 y D02.

Otra diferencia de D01 con respecto a la solicitud es la utilización alternativa por los inventores de hospedadores eucarióticos, y en particular fúngicos, para la expresión de las peroxidasas recombinantes (reivindicación 7), mientras que los sistemas divulgados en D01 son exclusivamente procarióticos (*E. coli*). Sin embargo, D03 anticipa la expresión de peroxidasas modificadas en hongos como "*Aspergillus oryzae*", siendo estas peroxidasas, al igual que en el caso anterior, análogas a las peroxidasas de D01 y de la solicitud, en cuanto al tipo de mutaciones que incorporan y a la metodología seguida para inducir las mutaciones. En consecuencia, la utilización de hospedadores fúngicos como alternativa para la expresión de las peroxidasas modificadas resultaría obvia para un experto en la materia combinando los procedimientos divulgados en los documentos D01 y D03.

La presente solicitud difiere adicionalmente de D01 en la utilización, para ser modificada, de una peroxidasa de una cepa particular de "*Phanerochaete chrysosporium*" (reivindicación 14), así como de una peroxidasa de "*P. chrysosporium*" que antes de la modificación presenta una de las 48 secuencias de la reivindicación 15.

Sin embargo, el empleo de estas peroxidasas particulares no aporta, de acuerdo con la descripción, ninguna ventaja técnica respecto al uso de la lignina peroxidasa de "*P. chrysosporium*" de D01. Por ello, se considera que el empleo alternativo de las peroxidasas de "*P. chrysosporium*" de la invención resultaría obvio para un experto en la materia.

Hoja adicional

En relación con las reivindicaciones 17-20 y 22, la diferencia entre la solicitud y D01 consiste en que los inventores han logrado obtener peroxidasas con mayor eficiencia catalítica para oxidar compuestos fenólicos a partir de modificaciones de la peroxidasa versátil de "*P. eryngii*". Estas modificaciones se basan, de acuerdo con la descripción y el estado de la técnica, en los estudios llevados a cabo por los inventores sobre los mecanismos moleculares de la enzima, y en particular sobre el papel de los distintos residuos aminoácidos que se encuentran comprendidos en el canal del hemo. Por ello, se considera que no resultaría obvia para un experto en la materia la obtención de peroxidasas mejoradas que incorporen las modificaciones particulares de la invención.

Por último, el documento D01 no contempla para la lignina peroxidasa de "*P. chrysosporium*" ningún uso de los relacionados en las reivindicaciones 27-28. Se considera pues, que dichas aplicaciones concretas de las enzimas de la invención no resultarían en principio obvias para un experto en la materia a partir del conocimiento de lo divulgado en D01.

Por lo tanto, según lo expuesto, las reivindicaciones 6-7 y 14-15 no cumplen el requisito de actividad inventiva. El objeto de las reivindicaciones 17-20, 22 y 27-28 sí satisface el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D04-D06, se refieren al Estado de la Técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.